

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. A. Berghaus

Die Rolle des Tumorstammzellmarkers CD133 in der Initiierung von Tumoren

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Axel Lechner

aus

München

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. O. Gires

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Stefan Endres

Prof. Dr. Doris Mayr

Priv. Doz. Dr. Uta Tschiesner

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. M. Canis

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 17.07.2014

Meiner lieben Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Krebs – Definition und epidemiologischer Überblick.....	3
2.2 Entstehung und Wachstum maligner Neoplasien.....	3
2.3 Epithelial-mesenchymale Transition (EMT).....	4
2.4 Zellen der Tumorumgebung (<i>tumor microenvironment</i>).....	5
2.5 Zufallsprinzip oder Hierarchie: Klonale Evolution und Tumorstammzelltheorie.....	5
2.6 Der Tumorstammzellmarker CD133.....	9
2.6.1 Struktur und Eigenschaften von CD133	9
2.6.2 Transkriptionsregulation des CD133-Gens und Promotoraktivität.....	10
2.6.3 Splicevarianten und Proteinisoformen von CD133	11
2.6.4 Subzelluläre Lokalisation und CD133 in Membranpartikeln	12
2.6.5 Posttranslationale Modifikation von CD133	13
2.6.6 Expression von CD133 in gesundem Gewebe	13
2.6.7 CD133-Epitopdetektion und Evaluation von CD133 als Stammzellmarker.....	15
2.6.8 CD133 ⁺ Stammzellen im gesunden Gewebe	15
2.6.9 CD133 in Krebsstammzellen solider Tumoren	17
2.6.10 Klinische Auswirkungen von CD133-Expression in Tumoren	19
2.6.11 Zusammenhang zwischen CD133-Expression in Tumoren und Therapieresistenz	20
2.6.12 Überblick über mögliche Funktionen von CD133 in gesunden und malignen Zellen ...	21
2.7 Zielsetzung.....	23
3 Material und Methoden.....	24
3.1 Material	24
3.1.1 Verwendete Chemikalien	24
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	25
3.1.3 Geräte.....	26
3.1.4 Kits, Standards und Enzyme	27
3.1.5 Antikörper.....	28
3.1.6 Oligonukleotidprimer	29
3.1.7 Plasmide	29
3.1.8 Zelllinien	30
3.1.9 Dienstleistungen.....	30

3.2	Methoden	31
3.2.1	Zellbiologische Methoden	31
3.2.1.1	Allgemeine Zellkulturtechniken.....	31
3.2.1.2	Zellzahlbestimmung	31
3.2.1.3	Transfektion von Zellen	32
3.2.1.4	Boyden-Kammer – Migration und Chemotaxis	32
3.2.1.5	<i>Scratch assay</i> – Migration	32
3.2.1.6	Zellzyklusverteilung	33
3.2.2	Durchflusszytometrische Messung	33
3.2.2.1	Bestimmung der Oberflächenproteinexpression und Zellsortierung	33
3.2.2.2	Messung der Zellzyklusverteilung	34
3.2.3	Proteinbiochemische Analyseverfahren	34
3.2.3.1	Quantitative Proteinbestimmung.....	34
3.2.3.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blotting	34
3.2.3.3	Enzymatische Deglykosylierung durch PNGase F.....	35
3.2.4	Molekularbiologische Analyseverfahren.....	35
3.2.4.1	RNA-Extraktion, quantitative RNA-Bestimmung und Generierung von cDNA.....	35
3.2.4.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese	36
3.2.5	Xenotransplantationsmodell.....	36
3.2.6	Histologische und immunhistochemische Analyseverfahren	37
3.2.6.1	Vorbereitung und Fixierung der Präparate	37
3.2.6.2	Immunhistochemische und immunzytochemische Färbung.....	37
3.2.6.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	37
3.2.7	Microarray-Genexpressionsanalyse	38
4	Ergebnisse	39
4.1	CD133-Expression in verschiedenen Karzinomzelllinien und HEK293-Wildtypellen	39
4.2	Magnet-assistierte Transfektion von Karzinomzelllinien	40
4.3	Etablierung stabiler CD133-Expression in HEK293-Zellen	42
4.4	Charakterisierung der CD133-Expression in HEK293-CD133 ^{high/low} -Zellen	43
4.5	Proliferationsverhalten und Zellzyklusverteilung von HEK293-CD133 ^{high/low} -Zellen	45
4.6	Evaluation des Tumorinitiierungsverhaltens von HEK293-CD133 ^{high/low} -Zellen <i>in vivo</i>	47
4.7	Mikroskopische Beurteilung entnommener HEK293-CD133 ^{high/low} -Tumoren.....	49
4.8	Analyse des Transkriptoms von HEK293-CD133 ^{high/low} -Zellen	50
4.8.1	Quantifizierung und Qualitätskontrolle der Ausgangs-RNA.....	51

4.8.2	Microarray-Hybridisierung, Datenanalyse und Identifikation differentiell exprimierter Gene	51
4.8.3	Validierung der Microarray-Ergebnisse ausgewählter Gene	53
4.8.4	Vergleich der Microarray-Ergebnisse von HEK293-CD133 ^{high/low} -Zellen mit CD133-transfizierten HeLa-Zellen	54
5	Diskussion	56
5.1	CD133-Expression in Karzinomzelllinien und HEK293-Wildtypzellen	56
5.2	Magnet-assistierte Transfektion verschiedener Zelllinien	57
5.3	Etablierung stabiler CD133-Expression in HEK293-Zellen	58
5.4	Charakterisierung der CD133-Expression in HEK293-CD133 ^{high/low} -Zellen	59
5.5	Wachstumsverhalten von HEK293-CD133 ^{high/low} -Zellen <i>in vitro</i>	59
5.6	HEK293-CD133 ^{high} -Zellen zeigen erhöhte Tumorinduktion und Proliferation <i>in vivo</i>	61
5.7	Identifikation möglicher Zielgene von CD133 in HEK293-Zellen	64
5.8	Vergleich der Microarray-Ergebnisse von HEK293-CD133 ^{high} -Zellen mit transient CD133-transfizierten HeLa-Zellen	65
6	Resümee und Ausblick	66
7	Literaturverzeichnis	69
8	Danksagung	79
9	Veröffentlichung	80

Abkürzungsverzeichnis

(c)-FLIP	<i>(cellular) FLICE-like inhibitory protein</i>
μ	Mikro
A2B5	<i>Neuron cell surface antigen A2B5</i>
Abb.	Abbildung
ABCB1/5	<i>ATP-binding cassette sub-family B member 1/5</i>
ABCG2	<i>ATP-binding cassette sub-family G member 2</i>
AEC	Aminoethylcarbazol
Akt	<i>V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
ALDH1	<i>Aldehyde dehydrogenase 1</i>
ALG5/8/10	<i>Asparagine-linked glycosylation 5/8/10 homolog</i>
AML	Akute myeloische Leukämie
ATP	Adenosintriphosphat
AVC	Angiogenetische vaskuläre Zellen
BACE2	<i>Beta-site APP-cleaving enzyme 2</i>
BAI3	<i>Brain-specific angiogenesis inhibitor 3</i>
Bax	<i>BCL2-associated X protein</i>
BCA assay	<i>Bicinchoninic acid assay</i>
Bcl-2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
BCRP1	<i>Breakpoint cluster region pseudogene 1</i>
bp	<i>Base pairs (Basenpaare)</i>
BW	<i>Backward</i>
CAF	Krebs-assoziierte Fibroblasten
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CELF2	<i>CUGBP, Elav-like family member 2</i>
Chk1/2	<i>Checkpoint kinase 1/2</i>
CMV	Zytomegalievirus
CNN2	Calponin 2
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
cRNA	Komplementäre Ribonukleinsäure
CSC	Krebsstammzelle
DECR1	<i>2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DUSP5	<i>Dual specificity phosphatase 5</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EpCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>

FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FC	<i>Fold change</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FERMT1	<i>Fermitin family homolog 1 (Drosophila)</i>
FITC	Fluoreszein Isothiozyanat
FSC	<i>Forward scatter</i>
FW	<i>Forward</i>
Fyn	<i>FYN oncogene related to SRC, FGR, YES</i>
g	Gramm
g	Schwerkraft
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GATA2	<i>GATA binding protein 2</i>
h	<i>Hours</i> (Stunden)
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HIF1/2 α	<i>Hypoxia inducible factor 1/2, alpha subunit</i>
HNSCC	<i>Head and neck squamous cell carcinoma</i>
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i>
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
IIC	Infiltrierende Immunzellen
IL	Interleukin
kD	Kilodalton
KLF11	<i>Kruppel-like factor 11</i>
l	Liter
lacZ	Lactose-Operon
M	Molar
mA	Milliampere
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MET	Mesenchymal-epitheliale Transition
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i>
MGAT3	<i>Mannosyl (beta-1,4-)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase</i>
MGMT	<i>O-6-methylguanine-DNA methyltransferase</i>
min	Minuten
miRNA	Mikro-Ribonukleinsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
Myc	<i>V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
n.a.	Nicht angegeben
NOD/SCID	<i>Non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency</i>
NSCLC	<i>Non-small-cell lung cancer</i>
OCT-4	<i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
ORF	<i>Open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCDH21	Protocadherin 21
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>

PDZ	<i>Postsynaptic density protein of Mr 95kDa</i> <i>Drosophila discs-large protein</i> <i>Zonula occludens protein 1</i>
PI	Propidiumiodid
PI3K	<i>Phosphatidylinositide 3-kinase</i>
PKB	<i>Protein kinase B</i>
PNGase F	Peptid-N-Glykosidase F
PROM1	Prominin 1
Raf	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RBP7	<i>Retinol binding protein 7, cellular</i>
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
RUNX3	<i>Runt-related transcription factor 3</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH2	<i>Src Homology 2</i>
siRNA	Kurze interferierende Ribonukleinsäure
SNAI1	<i>Snail family zinc finger 1</i>
SOX-2	<i>SRY (sex determining region Y)-box 2</i>
Sp1	<i>Specificity protein 1</i>
Src	<i>SRC v-src avian sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
SV40	<i>Simian virus 40</i>
SYK	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
Tab.	Tabelle
TGFβ	<i>Transforming growth factor beta</i>
TIC	Tumor-initiierende Zelle
TME	<i>Tumour microenvironment</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TWIST	<i>Twist basic helix-loop-helix transcription factor</i>
U	<i>Units</i> (Einheiten)
V	Volt
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR-2	<i>Vascular endothelial growth factor receptor 2</i>
ZEB	<i>Zinc finger E-box binding homeobox</i>
ZNF420	<i>Zinc finger protein 420</i>
ZNF91	<i>Zinc finger protein 91</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Zusammenfassung

Das Glykoprotein CD133, auch Prominin genannt, wurde erstmals 1997 als Transmembranprotein in humanen hämatopoetischen Stammzellen beschrieben (Miraglia, Godfrey et al. 1997). In den folgenden Jahren konnte gezeigt werden, dass CD133 in verschiedenen Krebsentitäten zur Identifikation Tumor-initiierender Zellen, auch Krebsstammzellen genannt, geeignet ist (Singh, Clarke et al. 2003; O'Brien, Pollett et al. 2007). Darüber hinaus wiesen mehrere Studien eine Assoziation zwischen CD133-Expression in Tumoren und einem signifikant verschlechterten Gesamtüberleben sowie einer erhöhten Therapieresistenz nach (Bao, Wu et al. 2006; Horst, Kriegel et al. 2008; Canis, Lechner et al. 2012).

Kürzlich konnte in Kopf-Hals-Tumoren demonstriert werden, dass eine erhöhte CD133-Expression zu epithelial-mesenchymaler Transition führt und hierbei die Src-Kinase beteiligt ist (Chen, Wu et al. 2011), welche ein bekannter Interaktionspartner von CD133 ist (Boivin, Labbe et al. 2009). Darüber hinaus ist jedoch weitgehend unklar, ob das Protein CD133 in Tumoren nur als Marker für Tumorstammzellen fungiert oder ob es zusätzlich eine funktionelle Relevanz besitzt, welche die klinischen Beobachtungen erklären könnte.

Die vorliegende Arbeit diene in erster Linie dazu, die Auswirkungen einer erhöhten CD133-Expression auf CD133⁺ Zellen unabhängig von der Rolle als Tumorstammzellmarker zu evaluieren. Hierzu wurden HEK293-Zellen mit einem CD133-Expressionsplasmid transfiziert. Dies führte zu einer starken CD133-Expression in einer kleinen Subpopulation der Zellen, welche durchflusszytometrisch isoliert wurde (HEK293-CD133^{high}). Ebenso wurde die Population mit der geringsten CD133-Expression isoliert (HEK293-CD133^{low}). Im Vergleich zu dieser Population ließ sich in HEK293-CD133^{high}-Zellen dauerhaft eine hohe CD133-Detektion erzielen. Ektopisch überexprimiertes CD133 in HEK293-Zellen wurde in vergleichbarer Weise wie endogenes CD133 in Caco-2-Zellen posttranslational in Form einer N-Glykosylierung modifiziert und korrekt in die Zellmembran integriert.

Die anschließende Charakterisierung der generierten Zelllinien ergab, dass ektopische CD133-Expression in HEK293-Zellen auf zentrale Zelleigenschaften *in vitro* keinen signifikanten Einfluss hat. Unter verschiedenen Wachstumsbedingungen konnte kein Effekt erhöhter CD133-Expression auf die Zellproliferation *in vitro* beobachtet werden. Des Weiteren ergab eine Analyse der Zellzyklusverteilung keine Unterschiede in der Reaktion auf eine zeitlich begrenzte Reduktion der Stimulation mit Wachstumsfaktoren. In HEK293-CD133^{high}- und HEK293-CD133^{low}-Zellen bewirkte Serumentzug für 22 Stunden gleichermaßen nur eine geringe Veränderung der Proliferation und damit keine messbare Reduktion des Anteils mitotisch aktiver Zellen. Ebenso wenig gelang es, Unterschiede in Migration oder Chemotaxis, die essentielle Eigenschaften bei Krebsprogression und Metastasierung darstellen (Roussos, Condeelis et al. 2011), zu finden. Hieraus konnten folglich keine Rückschlüsse auf mögliche Funktionen von CD133 bei der Initiierung und dem Wachstum maligner Tumoren gezogen werden, welche die zuvor erwähnten klinischen Auswirkungen von CD133-Expression in Tumoren erklären könnten.

Die folgende Evaluation des Tumorinitiierungs- und Wachstumsverhaltens *in vivo* erfolgte durch Xenotransplantation der Zelllinien in NOD/SCID-Mäuse. Dabei konnte ein signifikanter und starker Unterschied in der Fähigkeit zur Tumorbildung beobachtet werden, da HEK293-CD133^{high}-Zellen bei Injektion verschiedener Zellzahlen zuverlässig Tumoren bildeten. Im Gegensatz dazu zeigten

HEK293-CD133^{low}-Zellen ein deutlich geringeres Tumorigenitätspotential, da nur bei Injektion sehr hoher Zellzahlen ($5 \cdot 10^6$) in zwei von zehn Fällen nach 21 Tagen Tumoren explantiert werden konnten, bei niedrigerer Zellzahl die Tumorbildung jedoch komplett ausblieb. Insgesamt zeigen diese Beobachtungen, dass die Frequenz Tumor-initiierender Zellen innerhalb der HEK293-CD133^{high}-Zellpopulation bei Betrachtung des Tumorigenitätsverhaltens in NOD/SCID-Mäusen um mindestens das 1000fache erhöht ist im Vergleich zur HEK293-CD133^{low}-Population. Dies deutet auf eine funktionelle Relevanz von CD133 im Bezug auf die Fähigkeit von HEK293-Zellen zur Tumorbildung hin, nachdem CD133-Expression den einzigen, von außen induzierten Unterschied zwischen HEK293-CD133^{high}- und HEK293-CD133^{low}-Zellen darstellte.

Mittels Microarray-Analyse des Transkriptoms der HEK293-CD133^{high/low}-Zellen wurde im Anschluss ein möglicher molekularbiologischer Hintergrund der beobachteten Unterschiede in der Tumorigenität untersucht. Die Prozesse der mRNA-Transkription, deren Regulation sowie Zellproliferation und Differenzierung wurden als signifikant differentiell regulierte Prozesse identifiziert, welche das beobachtete Tumorigenitätsverhalten der HEK293-CD133^{high/low}-Zellen *in vivo* erklären könnten. Daraufhin wurde die mRNA-Expression einer Auswahl möglicher CD133-Zielgene überprüft, die an den genannten Prozessen beteiligt sind und selbst eine signifikante und starke Regulation zeigten. Hierbei konnten die Ergebnisse der Microarray-Analyse weitgehend bestätigt werden. Zusätzlich wurden die Expressionsmuster dieser Gene in transient mit CD133 transfizierten HeLa-Zellen mittels konventioneller RT-PCR evaluiert. Hierbei konnten jedoch keine eindeutigen Regulationsunterschiede festgestellt werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass CD133 in primär nicht tumorigenen HEK293-Zellen *in vitro* auf zentrale Zelleigenschaften, die in dieser Arbeit untersucht wurden, keinen signifikanten Einfluss nimmt. Bei der Tumorigenität *in vivo* ließ sich hingegen beobachten, dass HEK293-CD133^{high}-Zellen in immuninkompetenten Mäusen signifikant häufiger Tumoren bildeten wie HEK293-CD133^{low}-Zellen. Die molekularbiologischen Hintergründe dieser Beobachtung sind jedoch noch nicht abschließend geklärt.

2 Einleitung

2.1 Krebs – Definition und epidemiologischer Überblick

Der Überbegriff Krebs umfasst eine große Anzahl maligner Neoplasien, welche sich als Tumor oder nicht-solide Zellproliferation manifestieren können. Neben Karzinomen, Leukämien oder Lymphomen existieren seltenere Krebsformen, wie etwa Sarkome oder Teratome. All diese Formen unterscheiden sich in ihrem Ursprungsgewebe, ihrem Potenzial zur Proliferation, Gewebsinvasion und ihrer Fähigkeit zur Metastasierung.

Mit knapp 470.000 Neuerkrankungen pro Jahr allein in Deutschland zählt Krebs zu den häufigsten schwerwiegenden Erkrankungen. Obwohl seit 1999 zu beobachten ist, dass bei fast gleichbleibender Erkrankungsrate die altersstandardisierte Sterberate abnimmt, sind dennoch jährlich 215.000 Todesfälle durch Krebs in Deutschland zu beklagen (Robert-Koch-Institut 2012). Die positive Entwicklung hinsichtlich der verbesserten Überlebensraten - relative 5-Jahresüberlebensraten lagen in Deutschland für Männer 2008 bei 59%, für Frauen bei 64% (Robert-Koch-Institut 2012) - sind Ergebnis großer Bemühungen auf den Gebieten der Prävention, Früherkennung und Therapie. Um jedoch ein besseres Verständnis der Entstehung und des Wachstums von Neoplasien zu erhalten, bedarf es gerade auf dem Gebiet der Grundlagenforschung noch weiterer Anstrengungen.

2.2 Entstehung und Wachstum maligner Neoplasien

Allgemein gesprochen liegt bei einer malignen oder auch benignen Neoplasie eine Störung der Wachstumsregulation vor, welche eine autonome Gewebsneubildung bedingt (Arnold and Pschyrembel 2013).

Über die Jahre hat sich in der Krebsforschung das Mehrschrittmodell der Tumorigenese etabliert. Hierbei geht man davon aus, dass mehrere genetische Veränderungen in aufeinanderfolgenden Schritten für die Krebsentstehung nötig sind (Foulds 1958). Für diese Hypothese konnten in den folgenden Jahrzehnten zunehmend Hinweise erarbeitet werden. Es wurde davon ausgegangen, dass die Tumorentstehung auf einer klonalen Evolution einer mutierten Zelle basiert, welche durch mehrere Mutationsschritte entstanden ist und aufgrund ihrer erworbenen Eigenschaften einen natürlichen Selektionsvorteil gegenüber nicht-mutierten Zellen besitzt (Cairns 1975; Nowell 1976). Die Tatsache, dass histopathologisch verschiedene Stadien auf dem Weg zur Krebsentstehung unterschieden werden können, stützt die Theorie der schrittweisen Karzinogenese, ebenso wie die Beobachtung, dass die Inzidenz von Krebserkrankungen im Alter zunimmt (Hanahan and Weinberg 2000).

Obwohl die Mehrschrittkarzinogenese bei vielen Krebsarten zutrifft, gibt es Ausnahmen. So ist bei der chronisch myeloischen Leukämie in den meisten Fällen zunächst nur eine einzige reziproke chromosomale Translokation zur Entartung nötig (Knudson 2001). Neben *one-hit*-Krebsarten gibt es zudem Tumoren, deren Entstehung durch zwei genetischen Alterationen bedingt ist, wie beispielsweise das Retinoblastom, bei welchem die Inaktivierung beider Allele des Tumorsuppressorgens *RB1* die Krebsentstehung zur Folge hat (Melamud, Palekar et al. 2006).

Da Mutationen nicht zielgerichtet erfolgen, ergeben sich verschiedene Effekte auf die Zelle. Es kann sich ein Selektionsvorteil ausbilden (*driver lesion*), welcher zum Überleben und zur Proliferation der Zelle beiträgt. Daneben gibt es stille Mutationen (*passenger lesion*), die keinen Einfluss auf die Zelle haben. Im schlechtesten Fall für die Zelle entstehen Mutationen, die essentielle zelluläre Funktionen

so stark beeinträchtigen, dass die Zelle in Apoptose oder Seneszenz übergeht (Greaves and Maley 2012). Bei Krebszellen lässt sich zudem eine erhöhte Mutationsrate feststellen, was darauf zurückzuführen ist, dass die Mechanismen, die bei nicht-entarteten Zellen die genomische Integrität sichern, ausgehebelt werden (Hanahan and Weinberg 2011) oder durch Veränderungen (*mutator lesion*) die Anfälligkeit gegenüber Mutationen erhöht wird (Cahill, Kinzler et al. 1999). Neben diesen direkten Veränderungen des Erbguts spielen epigenetische Mechanismen, wie DNA-Methylierung, Histonmodifikation oder miRNA-Expression eine wichtige Rolle, durch welche die Expressionsmuster spezifischer Gene verändert werden können (Berdasco and Esteller 2010). Viele dieser Mechanismen führen in der Folge zu einem *gain of function* bei Proto-Onkogenen oder *loss of function* bei Tumorsuppressorgenen, wie *TP53*, das in etwa 60% aller Krebsfälle mutiert ist (Machado-Silva, Perrier et al. 2010).

Damit es normalen Zellen möglich ist, diesen Prozess der Mutation und letztendlich Entartung zum malignen Wachstum zu durchlaufen, müssen nach Hanahan und Weinberg zwei Grundvoraussetzungen gegeben sein. Erstens spielt die zuvor erwähnte genomische Instabilität auf dem Weg der Mehrschritt-Tumorigenese eine entscheidende Rolle (Merlo, Pepper et al. 2006; Hanahan and Weinberg 2011). Erreicht wird dies durch eine erhöhte Sensitivität gegenüber Mutagenen oder einem Funktionsausfall der Mechanismen, die dem Erhalt der genomischen Integrität dienen. Als zweite wichtige Eigenschaft gilt die Fähigkeit, eine die Tumorentstehung und das Wachstum fördernde Immunreaktion zu erzielen. Immunzellen, insbesondere des angeborenen Immunsystems können durch parakrine Interaktion mit den Tumorzellen supportiv in wichtigen Bereichen der Tumorentstehung mitwirken (Hanahan and Weinberg 2011).

Die dargelegten Grundvoraussetzungen erlauben es Zellen, die essentiellen Eigenschaften zu erlangen, die Krebszellen nach Hanahan und Weinberg auszeichnen (Hanahan and Weinberg 2000):

- Aufrechthaltung von Wachstumssignalen
- Unempfindlichkeit gegenüber Wachstumssuppressoren
- Umgehung von Apoptose
- Immortalisierung der Krebszelle
- Induktion von Angiogenese
- Invasion und Metastasierung

2.3 Epithelial-mesenchymale Transition (EMT)

Ein weiterer Prozess, dem im Rahmen von Krebserkrankungen eine wesentliche Funktion zukommt, ist die epithelial-mesenchymale Transition (EMT), die zunächst als ein Entwicklungsprozess in der Embryogenese beschrieben wurde. EMT bezeichnet den einen Arm eines reversiblen Prozesses, bei dem epitheliale Zellen, die zuvor fest im Zellverband integriert waren, einen mesenchymalen Phänotyp entwickeln. Dabei werden Zell-Zell-Adhäsionen gelöst, das Zytoskelett umorganisiert und Epithelzellen verlieren ihre Polarität (Savagner 2010). In der Folge erhöhen sich das Migrations- und Invasionspotential dieser Zellen sowie die Resistenz gegenüber Apoptose (Berx, Raspe et al. 2007). Diese Veränderung geht auf Proteinebene mit einer verminderten Expression epithelialer Marker wie E-cadherin oder Zytokeratinen einher. Stattdessen werden für mesenchymale Zellen charakteristische Proteine (N-cadherin, Fibronektin oder Vimentin) verstärkt exprimiert (Tiwari, Gheldof et al. 2012). EMT-Initiierung basiert auf einer komplexen Interaktion von Karzinomzellen mit den umliegenden Stromazellen. Neben Wachstumsfaktoren wie *platelet-derived growth factor*

(PDGF) oder dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) kommt insbesondere dem *transforming growth factor* β (TGF β) eine wichtige Rolle bei der EMT zu. Über geänderte Expression der Transkriptionsfaktoren ZEB, SNAIL, TWIST (*EMT master genes*) wird das Genexpressionsprofil der Zelle verändert, die E-cadherin-Expression vermindert und die EMT ermöglicht (Tiwari, Gheldof et al. 2012). Die Umsetzung des EMT-Programms ist jedoch noch von der Aktivität zusätzlicher Signalkaskaden abhängig (Kalluri and Weinberg 2009) und wird durch miRNAs, insbesondere der miR-200-Familie, beeinflusst (Bullock, Sayan et al. 2012).

EMT ermöglicht es Krebszellen, einen invasiven Phänotyp zu erlangen, dem besonders bei der Disseminierung und Metastasierung eine entscheidende Rolle zukommt. Daher erscheint es schlüssig, dass sich mittels Genexpressionsanalyse in kolorektalen Karzinomen vor allem an der Invasionsfront ein Genexpressionsprofil finden lässt, welches vereinbar mit EMT ist (Hlubek, Brabletz et al. 2007). Eine Eigenschaft von besonderer Bedeutung ist die Reversibilität der EMT. Nachdem sekundäre Tumorzellabsiedlungen aus Zellen, die mittels EMT aus dem Primärtumor migriert waren, histopathologisch oftmals wieder dem Primärtumor ähneln (Kalluri and Weinberg 2009), ist es plausibel, dass diese Zellen, die eine EMT vollzogen haben und aus dem Primärtumor migriert sind, auch den inversen Prozess der mesenchymal-epithelialen Transition (MET) durchlaufen. Welche Faktoren hierbei entscheidend sind, ist noch unklar. Es wird vermutet, dass die MET durch eine veränderte Tumorumgebung, wie zum Beispiel das Fehlen von EMT-Transkriptionsfaktoren, induziert wird (Scheel and Weinberg 2012). Obwohl das Konzept der EMT in der Krebsentwicklung zunächst umstritten war (Cardiff 2005), ist es mittlerweile als Erklärungsmodell für Invasion und Metastasierung weitgehend akzeptiert.

2.4 Zellen der Tumorumgebung (*tumor microenvironment*)

Seit man der Ansicht ist, dass die Tumorigenese nicht von den entarteten Krebszellen allein bewerkstelligt wird, sondern Zellen der unmittelbaren Tumorumgebung einen wichtigen Anteil beitragen, ist die Erforschung des *tumor microenvironment* (TME) immer stärker in den Fokus gerückt. Verschiedenste Zellen werden von den eigentlichen Tumorzellen rekrutiert und tragen zur Tumorentstehung bei. Diese Zellpopulationen lassen sich in angiogenetische vaskuläre Zellen (AVC), infiltrierende Immunzellen (IIC) und Krebs-assoziierte Fibroblasten (CAF) unterteilen, welche jeweils wiederum aus unterschiedlichen Zelltypen bestehen (Hanahan and Coussens 2012). Zellen des TME übernehmen wichtige Aufgaben im Bereich der Angiogenese, Proliferationsstimulation, Invasion oder Metastasierung. Dies kann sowohl direkt, etwa durch die Ausschüttung proteolytischer Enzyme, als auch indirekt geschehen, indem Stromazellen beispielsweise das geeignete Milieu zur Initiierung der EMT ausbilden (Pietras and Ostman 2010; Ruffell, DeNardo et al. 2010; Hanahan and Coussens 2012).

2.5 Zufallsprinzip oder Hierarchie: Klonale Evolution und Tumorstammzelltheorie

Das dominierende Modell der Krebsentstehung und des Wachstums von Neoplasien ist das der klonalen Evolution (Nowell 1976), nach welcher das Wachstum durch eine Reihe somatischer Mutationen und der klonalen Expansion der jeweils bestangepassten Zellen bedingt ist. Die Basis ist also eine fortwährende Änderung der Zelleigenschaften durch zufällige Mutationen des Erbguts, welche funktionelle und phänotypische Veränderungen zur Folge haben (Stratton 2011). Daneben können epigenetische Einflüsse sowie Besonderheiten der lokalen Tumorumgebung die Eigenschaften beeinflussen (Shackleton, Quintana et al. 2009). Metastasierung ist ebenso als Ergebnis eines Selektionsprozesses zu sehen, welcher jedoch nicht unbedingt in der Hauptpopulation

des Primärtumors vonstattengehen muss. Vielmehr kann auch eine nicht-dominante Subpopulation Quelle metastasierender Zellen sein (Stratton 2011).

Abgesehen von Tumorzellen, welche durch Mutationen in ihrer Proliferation gehindert werden und dadurch in die Seneszenz oder Apoptose übergehen, besitzen alle Zellen eines Tumors nach dieser Theorie prinzipiell das gleiche tumorigene Potential. Es ist also keine klare Hierarchie im Aufbau des Tumors vorhanden. Daher ist es für erfolgreiche Tumorthapien wichtig, alle Zellen gleichermaßen anzugreifen, um das gesamte tumorigene Potential zu eradizieren. Eine mögliche Resistenzentwicklung unter Therapie lässt sich wiederum damit erklären, dass hierbei ein Selektionsdruck auf die Tumorzellen ausgeübt wird, dem resistente Zellen durch geeignete Mutationen entgehen (Greaves and Maley 2012). Dieses Modell lässt sich für die Grundlage des Wachstums der meisten Krebserkrankungen heranziehen.

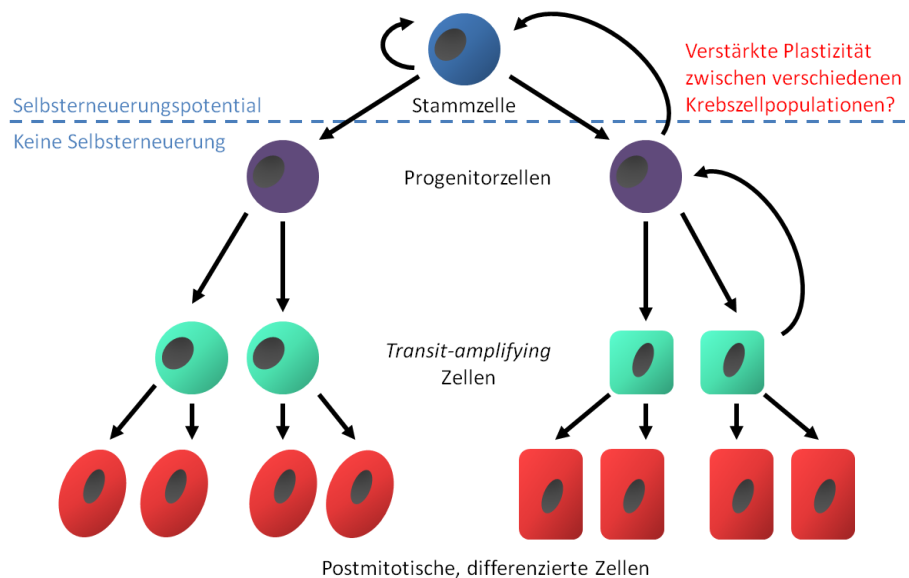


Abb. 2-1: Darstellung der hierarchischen Gliederung nach dem Tumorstammzellmodell mit Unterscheidung von CSCs und Zellen mit vermindertem Selbsterneuerungspotential. Es wird zunehmend davon ausgegangen, dass zwischen den verschiedenen Zellpopulationen eine verstärkte Plastizität mit potentieller Wandelbarkeit von nicht-CSCs in CSCs besteht (nach Gupta et al. 2009).

In den letzten zwei Dekaden hat sich mit der Tumorstammzelltheorie ein weiteres Konzept zum zellulären Aufbau von Krebsarten etabliert (Abb. 2-1). Hierbei wird davon ausgegangen, dass entartete Zellen hierarchisch organisiert sind. Einerseits umfasst der Tumor Krebsstammzellen (*cancer stem cells*; CSCs) oder Tumor-initiiierende Zellen (*tumor initiating cells*; TICs), welche eine teils kleine Subpopulation des Krebses darstellen und sich durch das Potential zur Selbsterneuerung und zur aberranten Differenzierung auszeichnen. Andererseits beinhalten nach dieser Theorie Tumoren stärker differenzierte Tochterzellen, die aus den Krebsstammzellen hervorgehen. Trotz einiger Gemeinsamkeiten in Bezug auf Genexpressionsprofil, epigenetische Regulation oder Signalwegaktivierung sind CSCs von normalen Stammzellen abzugrenzen und entwickeln sich auch nicht zwangsläufig aus diesen (Marotta and Polyak 2009). Krebsstammzellpopulationen lassen sich insbesondere anhand geeigneter Oberflächenmarker aus der Tumormasse anreichern und besitzen in Xenotransplantationsmodellen erhöhtes Tumorinduktionspotential. Die so gewonnenen Tumoren spiegeln die hierarchische Struktur des Primärtumors wider (Dalerba, Cho et al. 2007). Differenzierte Tochterzellen, die einen Großteil der Tumormasse ausmachen, besitzen dieses CSC-Potential nicht oder nur in geringerem Maße (Gupta, Chaffer et al. 2009; Shackleton, Quintana et al. 2009). Der

Differenzierungsprozess geht zwar nicht zwangsläufig mit Veränderungen der Zellmorphologie einher, führt jedoch zu einem größtenteils irreversiblen Verlust der Tumorigenität und zu funktioneller und phänotypischer Heterogenität innerhalb des Tumors. Es wird angenommen, dass dies auf epigenetischen Veränderungen basiert (Magee, Piskounova et al. 2012).

Der Anteil tumoriger Zellen in einzelnen Tumoren ist sehr variabel und liegt in der initialen Studie zu CSCs in Mammakarzinomen bei 11-35% (Dalerba, Cho et al. 2007). Mögliche Einflüsse hierauf sind interindividuell unterschiedliche TMEs, das Stadium der malignen Progression oder die akkumulierten Mutationen (Gupta, Chaffer et al. 2009). Zusätzlich gibt es Hinweise, dass die Ursprungszelle des malignen Wachstums einen Einfluss auf die Heterogenität von Tumoren und die Häufigkeit und die Eigenschaften der Krebsstammzellen hat. In experimentell induzierten Krebsarten konnten Stammzellen mit einem erhöhten Potential zur Selbsterneuerung als Ursprungszellen ausgemacht werden, in anderen Tumoren waren es Progenitorzellen oder differenzierte Zellen, die beispielsweise durch Mutationen im *Sonic-hedgehog*-Signalweg (Yang, Ellis et al. 2008) einen ektopisch aktivierten Selbsterneuerungsmechanismus zeigten (Magee, Piskounova et al. 2012).

Beispiele von Krebsarten, die dem Tumorstammzellmodell folgen, sind seit langem bekannt. Das Teratokarzinom, ein Keimzelltumor, bildet von malignen Stammzellen ausgehend, verschiedenste, differenzierte Gewebe aus. Die Pluripotenz der zugrundeliegenden Krebsstammzellen konnte schon vor Jahrzehnten gezeigt werden (Kleinsmith and Pierce 1964). Ein Zusammenhang mit anderen Krebsarten, insbesondere Leukämien, wurde erst später entdeckt. Aus Leukämiezellen von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) gelang es, eine Subpopulation anhand bestimmter Oberflächenmarker zu identifizieren, welche im Vergleich zu den restlichen Leukämiezellen in der Lage war, in NOD/SCID-Mäusen eine humane AML hervorzurufen, die eine ähnliche Differenzierung und hierarchische Struktur wie die ursprüngliche Krankheit zeigte (Bonnet and Dick 1997). In den folgenden Jahren konnten auch in soliden Neoplasien Tumor-initiierende Subpopulationen bestimmt werden. Hierzu zählen Mammakarzinome (Al-Hajj, Wicha et al. 2003), Kolonkarzinome (Ricci-Vitiani, Fabrizi et al. 2009), Glioblastome und Medulloblastome (Singh, Hawkins et al. 2004), Pankreaskarzinome (Li, Heidt et al. 2007) oder Kopf-/Halstumoren (Krishnamurthy and Nor 2012).

Im Hinblick auf die Ausprägung der CSC-Populationen in manchen Krebsarten gibt es große interindividuelle Unterschiede (Magee, Piskounova et al. 2012). Beispielsweise ließen sich in einer Studie zwar in 13 von 14 AML-Fällen CSCs isolieren, aber neben der bekannten CD34⁺/CD38⁻-CSC-Population konnten CSCs in der Mehrzahl der Fälle mindestens in einer der CD34⁺/CD38⁺, CD34⁻/CD38⁺, CD34⁻/CD38⁻-Populationen identifiziert werden (Eppert, Takenaka et al. 2011). Dalerba et al. schlugen vor, dass für die Annahme des Krebsstammzellmodells in den einzelnen Tumorentitäten bestimmte Kernvoraussetzungen gegeben sein müssen. Hierzu gehört in erster Linie, dass die Isolation mittels definierter Marker und Tumorinduktion im Modell reproduzierbar sind. Ferner muss der Tumor im Modell das ganze Spektrum der phänotypischen Heterogenität des Primärtumors rekapitulieren (Dalerba, Cho et al. 2007). Häufig untersuchte Tumorstammzellmarker sind beispielsweise CD44, CD133, CD24, CD166, EpCAM und ALDH1 (Gires 2011).

Im Rahmen der Metastasierung scheinen CSCs ebenfalls von Bedeutung zu sein. In Pankreas- oder Kolonkarzinomen konnte ein erhöhtes Metastasierungspotential der tumorigenen Subpopulation nachgewiesen werden (Magee, Piskounova et al. 2012). In Mammakarzinomen zeigten durch CSC-Marker isolierte Zellen eine erhöhte Expression von Proteinen und Transkriptionsfaktoren, welche charakteristisch für EMT sind (Mani, Guo et al. 2008) und somit zu einer verstärkten Invasion und

Metastasierung beitragen könnten. Welcher Zusammenhang genau zwischen CSCs und EMT besteht, ist bisher noch nicht abschließend geklärt. Man geht aber zunehmend davon aus, dass die Ausprägung von CSCs, ähnlich wie bei der EMT, umgebungsabhängig ist und sogar eine Reversibilität der Differenzierung von CSCs besteht, was in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen CSCs und differenzierten Zellen resultiert (Abb. 2-1) (Gupta, Chaffer et al. 2009). Ein Hinweis auf die Verknüpfung von CSC-Status und EMT ist beispielsweise, dass EMT-Induktion in immortalisierten Mammaepithelzellen in Kultur zur Ausbildung eines $CD44^+/CD24^-$ -Phänotyps führt (Chaffer, Brueckmann et al. 2011), der charakteristisch für Mamma-CSCs ist (Al-Hajj, Wicha et al. 2003). In Plattenepithelkarzinomen des Kopf-/Halsbereichs wurde zudem nachgewiesen, dass zwei verschiedene CSC-Populationen koexistieren, welche einen Zusammenhang zwischen CSCs, EMT und Metastasierungspotential verdeutlichen: CSCs mit epithelialen Eigenschaften und hoher Proliferationsrate (non-EMT-CSCs; $CD44^{high}/EpCAM^{high}$) und EMT-CSCs ($CD44^{high}/EpCAM^{low}$) mit mesenchymalen Eigenschaften, welche zur Migration befähigt sind und somit ein erhöhtes Metastasierungspotential besitzen. Beide Populationen zeigten die Fähigkeit, den jeweils anderen Phänotyp zu erlangen, wobei von den EMT-CSCs nur $ALDH1^+$ Zellen zum Übergang in non-EMT-CSCs befähigt waren (Biddle, Liang et al. 2011).

Für eine erfolgreiche Therapie von Tumoren, die dem Tumorstammzellmodell folgen, müssen – verglichen mit dem Modell der klonalen Evolution – andere Grundsätze gelten. Zwar gehört Resistenz gegenüber Chemotherapeutika oder Bestrahlung nicht zu den definierenden Eigenschaften von CSCs (Magee, Piskounova et al. 2012), dennoch zeigen CSCs oftmals eine erhöhte Expression beispielsweise von Effluxpumpen der *ATP-binding cassette transporter*-Familie, welche eine gesteigerte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika vermitteln können (Moitra, Lou et al. 2011; Alison, Lin et al. 2012). Zudem wurde in vielen Studien eine Assoziation von CSC-Markerexpression mit schlechter Prognose, erhöhter Rezidivrate oder Therapieresistenz beschrieben. Daher muss eine Therapie darauf abzielen, die für die Tumorprogression wichtigen CSCs anzugreifen und weniger die Tochterzellen, die für den Krankheitsprogress eine untergeordnete Rolle spielen.

Insgesamt stellt das Tumorstammzellmodell eine Ergänzung des Konzepts der klonalen Evolution dar. Beide Theorien erklären die beobachtete Heterogenität von Tumoren, letztere Theorie vor allem durch die epigenetischen Veränderungen, die in einer hierarchischen Struktur resultieren. Erstere Theorie hingegen erklärt insbesondere über genetische Änderungen die geno- und phänotypische Heterogenität. Im Rahmen des Tumorstammzellmodells beschränken sich diese genetischen Änderungen auf die CSC-Subpopulation, welche die Mutationen letztlich an die differenzierten Tochterzellen weitergeben.

2.6 Der Tumorstammzellmarker CD133

Als einer der am häufigsten verwendeten Marker zur Identifikation von Tumor-initiiierenden Zellen ist das Protein CD133 im letzten Jahrzehnt zunehmend in den Fokus der Forschung gerückt (Mizrak, Brittan et al. 2008). Dennoch fehlen genaue Erkenntnisse über Regulation und Funktion des Moleküls bisher weitgehend.

2.6.1 Struktur und Eigenschaften von CD133

Entdeckt wurde das Glykoprotein CD133 1997 im Rahmen zweier unabhängiger Untersuchungen. Zum einen wurde es als humanes Transmembranprotein von CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen beschrieben (Miraglia, Godfrey et al. 1997; Yin, Miraglia et al. 1997), zum anderen konnte es im murinen Neuroepithel nachgewiesen werden (Weigmann, Corbeil et al. 1997).

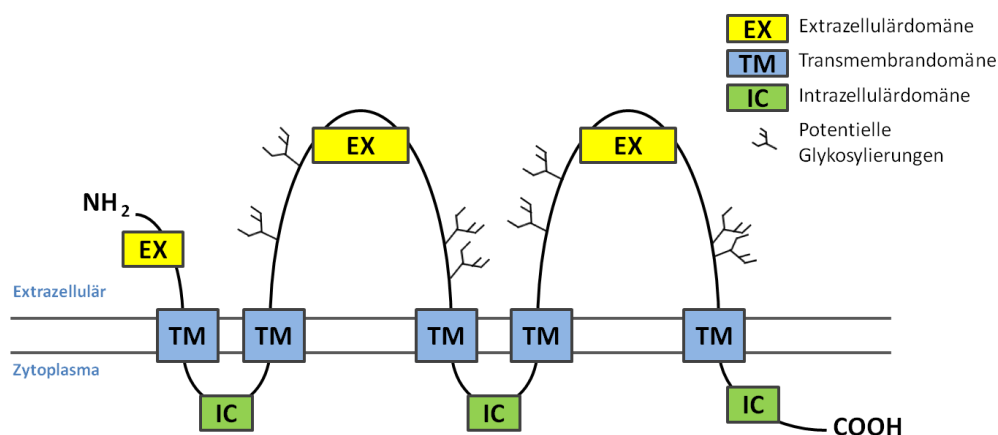


Abb. 2-2: Abgebildet ist die Membrantopologie von CD133 nach Abspaltung des Signalpeptids mit fünf Transmembrandomänen und jeweils drei intra- und extrazellulären Domänen. Innerhalb jeder der beiden Extrazellulärschleifen befinden sich vier mögliche Sequenzen für N-Glykosylierung (nach Kemper et al. 2010 und Jaszai et al. 2007).

CD133 ist der erste Vertreter der Prominin-Proteinfamilie und besitzt fünf Transmembrandomänen, wodurch zwei große extrazelluläre Schleifen mit einer Länge von jeweils über 200 Aminosäuren gebildet werden. Der N-Terminus liegt extrazellulär, das C-terminale Ende intrazellulär (Miraglia, Godfrey et al. 1997). Die extrazellulären Schleifen bieten jeweils vier potentielle Ansatzpunkte für N-glykosidische Bindungen (Abb. 2-2). Im glykosylierten Zustand beträgt das Molekulargewicht des humanen CD133 etwa 115-120kD, welches sich nach Behandlung mit PNGase F, einem Enzym, welches Glykosylreste entfernt, auf 92-95kD reduziert (Kemper, Sprick et al. 2010). Dies entspricht dem berechneten Molekulargewicht nach Abspaltung des N-terminalen Signalpeptids, das die Aminosäuren 1-19 umfasst (Boivin, Labbe et al. 2009).

Das beim Menschen auf Chromosom 4 liegende Gen *PROM1* (Gene ID 8842), welches das Protein CD133 kodiert, besitzt eine komplexe Struktur mit fünf verschiedenen Promotoren in der 5'-untranslatierten Region (Abb. 2-3) und 28 Exons, von denen sieben fakultativ in mRNA transkribiert werden (Fargeas, Huttner et al. 2007). Speziesübergreifend wurden bisher zwölf verschiedene Isoformen beschrieben und sieben hiervon in humanen Zellen nachgewiesen (Tab. 2-1). Diese unterscheiden sich insbesondere im N-terminalen Bereich (Exon 3, 5) und im intrazellulären C-Terminus (Exon 26a/b, 27, 28) (Kemper, Sprick et al. 2010). Zudem können sich humane Splicevarianten im Vorhandensein von Exon 25 unterscheiden (Fargeas, Huttner et al. 2007).

Mittels immunhistochemischer Färbungen des Epitops AC133, welches sich innerhalb der zweiten extrazellulären Schleife des Proteins CD133 befindet (Miraglia, Godfrey et al. 1997; Yin, Miraglia et al. 1997), ließ sich ein charakteristisches Färbemuster demonstrieren, das sich auf Membranprotrusionen beschränkt. Daher wird CD133 auch als Prolin-1 bezeichnet (lat.: prominere = hervorstehen). Ein weiterer Vertreter der Prolin-Familie, Prolin-2, stellt sich durch ein ähnliches Färbemuster dar, wenn auch weniger polar, da im Vergleich zur apikalen AC133-Färbung auch ein Nachweis im basolateralen Bereich von Zellen möglich ist (Mizrak, Brittan et al. 2008). Auch in der Exon-Intron-Sequenz sowie der Proteinstruktur sind Ähnlichkeiten zwischen Prolin-1 und -2 zu erkennen (Fargeas, Florek et al. 2003).

Insgesamt zeigt CD133 eine speziesübergreifend (Primaten/Maus/Ratte) ähnliche zelluläre Lokalisationen und vergleichbare Exon/Intron-Begrenzungen (Fargeas, Huttner et al. 2007). Obwohl die Sequenzübereinstimmung zwischen humanem und murinem CD133 nur bei etwa 60% liegt (Mizrak, Brittan et al. 2008), wurde nach der Erstbeschreibung beider Proteine davon ausgegangen, dass es sich bei der murinen und humanen Variante um homologe Proteine handelt (Corbeil, Roper et al. 1998). Dies bestätigte sich durch die Sequenzierung des humanen Genoms, bei der kein weiteres Gen mit größerer Ähnlichkeit zum murinen CD133 gefunden wurde (Fargeas, Corbeil et al. 2003).

2.6.2 Transkriptionsregulation des CD133-Gens und Promotoraktivität

Die Transkription des CD133-Gens im Menschen ist komplex reguliert und bisher nur teilweise verstanden. Zunächst gibt es fünf verschiedene Promotoren P1-P5, an denen die Transkription beginnen kann, was jeweils in einem unterschiedlichen Exon 1 resultiert (Abb. 2-3) Die Aktivität dieser Promotoren ist gewebsabhängig. So sind in Leber, Niere, Pankreas, Plazenta, Lunge, Milz und Kolon P1 und P2 aktiv, wohingegen Gehirn, Ovarien, fetale Leber und CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen nur P1-Aktivität zeigen. P2-Aktivität konnte in Dünndarm und Prostatagewebe nachgewiesen werden (Shmelkov, Jun et al. 2004) und P4 ist exklusiv in Hodengewebe aktiv, in welchem zudem P5-Aktivität vorhanden ist (Tabu, Sasai et al. 2008). P3 ließ sich in Kolon (Kemper, Sprick et al. 2010), Gehirn und Niere nachweisen (Tabu, Sasai et al. 2008).

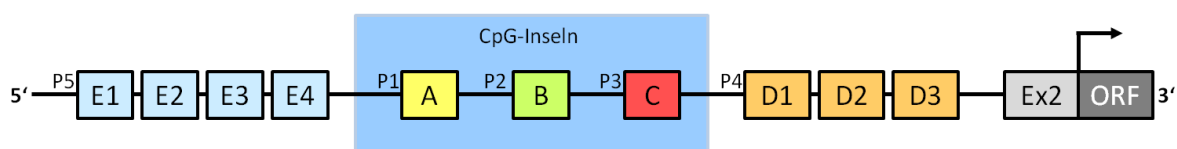


Abb. 2-3: Aufbau der 5'-untranslatierten Region des CD133-Gens mit den alternativen Promotoren P1-P5, welche jeweils korrespondierende Exons A-E4 besitzen. Bei Promotoraktivität von P4 oder P5 wurden verschiedene Exonkombinationen aus den jeweiligen Exongruppen (E1-E4; D1-D3) nachgewiesen. Die Translationsinitiation beginnt in Exon 2 (Ex2). P1-P3 sind bei CpG-Inseln lokalisiert und unterliegen Transkriptionsregulation mittels CpG-Methylierung. ORF stellt den offenen Leserahmen dar (nach Shmelkov et al. 2004).

Es ist bekannt, dass die Promotoren P1-3 über Methylierung benachbarter CpG-Inseln beeinflusst werden (Abb. 2-3) (Shmelkov, Jun et al. 2004). Hypermethylierung von CpG-Inseln kann eine verminderte, Hypomethylierung eine erhöhte Transkription bewirken. Folglich führte eine Hypermethylierung der Promotoren P1 und P2 *in vitro* zu einer verminderten Promotoraktivität, wie Shmelkov *et al.* berichteten (Shmelkov, Jun et al. 2004). Welchen weiteren Regulationsmechanismen die Promotoraktivierung des CD133-Gens unterliegt, ist jedoch noch unklar. Die Analyse der Promotoraktivität in Kolongewebe durch Kemper *et al.* zeigte, dass zumindest in gesundem und

maligmem Kolongewebe sowie in Kolon-CSCs und differenzierten Kolonkarzinomzellen P1-P3 gleichermaßen aktiv waren und daher kein Hinweis auf eine differentielle Regulation der Promotoraktivierung in dieser Untersuchung gefunden werden konnte (Kemper, Sprick et al. 2010).

Erwartungsgemäß konnte eine inverse Korrelation zwischen Methylierung und CD133-Expression bei Ovarialkarzinomen (Baba, Convery et al. 2009), Kolonkarzinomen (Yi, Tsai et al. 2008; Jeon, Kim et al. 2010), Endometriumkarzinomen (Friel, Zhang et al. 2010) und hepatozellulären Karzinomen beobachtet werden. In letzterem Beispiel wurde zudem ein wichtiger Einfluss von TGFβ1 auf den Methylierungsstatus des CD133-Gens demonstriert (You, Ding et al. 2010). In Prostatakarzinomen wurde zwar in Zelllinien eine reduzierte CD133-Expression bei Promotorhypermethylierung gesehen, jedoch kein unterschiedlicher Methylierungsstatus zwischen Tumor-initiierenden Zellen (CD133⁺) und differenzierten Zellen (CD133⁻) aus Primärgewebe (Pellacani, Packer et al. 2011).

Bedeutung könnte der Promotormethylierung von CD133 in der Progression von Krebs zukommen, nachdem Magenkarzinome im Frühstadium eine vermehrte Demethylierung des CD133-Gens zeigen (Hibi, Sakata et al. 2010). Bei kolorektalen Karzinomen ist dies im fortgeschrittenen Stadium der Fall. Hier ist auch ein Trend zu vermehrter Lymphknotenmetastasierung zu sehen, wenn das Gen demethyliert ist (Hibi, Sakata et al. 2009). Verstärkte Methylierung von Promotoren kann dazu führen, dass Transkriptionsfaktoren nicht mehr binden können und somit die Transkription reduziert wird. In Glioblastomzellen wurden kürzlich *specificity protein 1* (Sp1) und Myc als Transkriptionsfaktoren identifiziert, die im Bereich des Promotors P1 binden können und aktiv in die Regulation der CD133-Genexpression involviert sind (Gopisetty, Xu et al. 2012).

Ferner kann neben der DNA-Methylierung die Histonmodifikation zur Transkriptionsregulation des CD133-Gens beitragen. CD133⁻ Ovarialkarzinomzellen zeigen nach Behandlung mit Histon-Deacetylase-Inhibitoren eine erhöhte CD133-Proteinexpression auf der Zelloberfläche (Baba, Convery et al. 2009). Auch in Gliomzelllinien (Tabu, Sasai et al. 2008) oder Prostatakarzinomzellen (Pellacani, Packer et al. 2011) erhöht sich die CD133-mRNA-Expression nach Inkubation mit Histon-Deacetylase-Inhibitoren. Nachdem Histonmodifikationen bei der Differenzierung CD133⁺ hämatopoetischer Stammzellen eine wichtige Rolle spielen (Cui, Zang et al. 2009), kommt dieser Art der Transkriptionsregulation in CD133⁺ Krebszellen somit möglicherweise ebenfalls eine Funktion zu.

2.6.3 Splicevarianten und Proteinisoformen von CD133

Durch alternatives Splicen entstehen verschiedene mRNA-Splicevarianten von CD133 (Fargeas, Huttner et al. 2007), die zur Generierung von sieben verschiedenen humanen Proteinisoformen führen (Tab. 2-1). Diese Isoformen zeigen eine Sequenzübereinstimmung von 95% (<http://www.uniprot.org/align/20121001214QKUPKMD>) und umfassen zwischen 825 und 865 Aminosäuren. Unterschiede in der Aminosäuresequenz finden sich hauptsächlich im intrazellulären C-terminalen Abschnitt. Einige Proteinisoformen weisen hier PDZ-Domänen (*Postsynaptic density protein of Mr 95kDa*, *Drosophila Discs-Large protein*, *Zonula occludens protein 1*; PDZ) auf (Fargeas, Huttner et al. 2007), welche an der Bindung von Signalproteinen und Zytoskelettbestandteilen beteiligt sind (Ranganathan and Ross 1997). Zudem wird ihnen eine Rolle bei Zell-Zell-Interaktionen sowie in der Aufrechterhaltung von Zellpolarität zugeschrieben (Tonikian, Zhang et al. 2008). Ein weiterer Unterschied zwischen den Isoformen liegt in der Anzahl der C-terminalen Tyrosin-Phosphorylierungsstellen (Boivin, Labbe et al. 2009).

Tab. 2-1: Aufgelistet sind sämtliche bisher nachgewiesene humane Splicevarianten von CD133 und deren korrespondierende Proteinisoformen (Fargeas *et al.* 2007; Protein Knowledgebase UniProtKB).

Splicevariante (mRNA)	GenBank Accession Number	Vorhandene fakultative Exons	Isoform (Protein)	Anzahl der Aminosäuren	Berechnetes Molekulargewicht
Prominin-1.s1	AF027208	9, 26b, 27,28	2 (AC133-2)	856	96,3 kD
Prominin-1.s2	AF507034	3, 9, 26b, 27,28	1 (AC133-1)	865	97,2 kD
Prominin-1.s7	AY449690	9, 28	5	825	92,7 kD
Prominin-1.s9	AY449689	9, 25, 26b	3	830	93,3 kD
Prominin-1.s10	AY449691	9, 26b, 28	4	833	93,7 kD
Prominin-1.s11	AY449692	3, 9, 28	6	834	93,7 kD
Prominin-1.s12	AY449693	3, 9, 26b, 28	7	842	94,6 kD

Die Expression der Splicevarianten ist gewebsspezifisch verschieden und ändert sich beispielsweise im Gehirn von Mäusen im Verlauf der Entwicklung (Fargeas, Joester *et al.* 2004; Corbeil, Joester *et al.* 2009). Die am weitesten verbreitete Variante in humanem Gewebe ist Prominin-1.s1, welche in verschiedenen fetalen (Leber, Skelettmuskulatur, Niere, Herz) und adulten (Pankreas, Leber, Niere, Lunge Plazenta) Geweben, sowie in Krebszellen nachgewiesen wurde (Yu, Flint *et al.* 2002; Elsaba, Martinez-Pomares *et al.* 2010). Prominin-1.s2 ist dagegen in fetalem Gehirn am stärksten ausgeprägt und in adulter Skelett- und Herzmuskulatur (Yu, Flint *et al.* 2002). Auch hämatopoetische Stammzellen weisen eine s1-Expression auf, ebenso Kolon-CSCs (Kemper, Sprick *et al.* 2010). In letzteren konnten neben der dominanten s1-Expression auch alle anderen Splicevarianten detektiert werden. Interessanterweise war jedoch keine Veränderung des Expressionsmusters während der Differenzierung der CSCs zu erkennen, was Hinweise auf die Rolle der verschiedenen Splicevarianten und Proteinisoformen hätte geben können.

2.6.4 Subzelluläre Lokalisation und CD133 in Membranpartikeln

CD133 ist in den Membranprotrusionen, in denen es fast ausschließlich lokalisiert ist, in Mikrodomänen (*lipid rafts*) organisiert. Diese weisen einen erhöhten Anteil an Sterolen und Sphingolipiden im Vergleich zur umgebenden Plasmamembran auf und es wird ihnen eine Funktion bei der Signaltransduktion zugeschrieben (Corbeil, Marzesco *et al.* 2010). In den Mikrodomänen bindet CD133 spezifisch an Cholesterol, das eine wichtige Rolle in der subzellulären Lokalisation von CD133 spielt, nachdem gezeigt wurde, dass Cholesterolentzug zu reversiblen, weniger polaren Umverteilungen von CD133 in der Membran führt (Roper, Corbeil *et al.* 2000). Durch Deletion des intrazellulären C-Terminus, der als wahrscheinlichster Bereich für Proteinbindungen gilt, kommt es hingegen nicht zu einer Umverteilung von CD133 in der Membran (Corbeil, Roper *et al.* 2001).

Insgesamt zeigt CD133 in epithelialen sowie nicht-epithelialen Zellen eine Lokalisation in Membranprotrusionen, welche in humanen Zellen unabhängig von der Splicevariante ist (Bauer, Fonseca *et al.* 2008). Es wurde jedoch berichtet, dass die Isoformen s4 und s5 in der Maus die Zelloberfläche nicht erreichen, sondern intrazellulär verbleiben. Ein schwaches Färbemuster in der Immunfluoreszenz nach Permeabilisierung der Zellen und eine fehlende proteinbiochemische Detektion von s4 und s5 wurden von Fargeas *et al.* als Hinweis für den Verbleib und die Degradation im endoplasmatischen Retikulum gewertet (Fargeas, Joester *et al.* 2004).

Zusätzlich zur Lokalisation innerhalb der Zelle wurde CD133 auch in Membranpartikeln in Körperflüssigkeiten (Speichel, Seminalflüssigkeit, Urin) nachgewiesen (Marzesco, Janich *et al.* 2005).

Nachdem gezeigt werden konnte, dass diese Partikel (Prominosomen), zusätzlich bei der Differenzierung von CD133⁺ Caco-2-Zellen (Kolonkarzinomzelllinie) (Marzesco, Janich et al. 2005) und von murinen neuronalen Progenitorzellen während der Zellteilung freigesetzt werden können (Dubreuil, Marzesco et al. 2007), wird spekuliert, ob ihnen im Rahmen der Regulation von Differenzierung und dem Erhalt von Stammzeleigenschaften eine Rolle zukommt.

2.6.5 Posttranslationale Modifikation von CD133

Eine erste posttranslationale Modifikation erfährt das CD133-Protein durch die Abspaltung des 19 Aminosäuren langen N-terminalen Signalpeptids. Darüber hinaus ist bekannt, dass CD133 in glykosylierter Form auftritt. Welche Rolle der Glykosylierung genau zukommt und welchen Regulationsmechanismen sie unterliegt, ist bisher unklar.

Diese Art der Proteinmodifikation hat erheblichen Anteil an der membranständigen Lokalisation von CD133, da eine Mutation aller Glykosylierungsstellen zu einem intrazellulären Verbleib von CD133 führt. Bei Deletion jeweils nur einer Glykosylierungsstelle ist dieser Effekt nicht zu beobachten (Mak, Blakely et al. 2011). Zudem erniedrigt sich nach Deglykosylierung *in vitro* der CD133-Proteingehalt von Zellen, was ein Hinweis dafür ist, dass die Glykosylierung essentiell für die Proteinstabilität ist (Mak, Blakely et al. 2011). Ferner wurde beispielsweise in Kolonkarzinomen ein verminderter Glykosylierungsstatus nach Differenzierung von CSCs beobachtet, was in der Änderung der Tertiärstruktur des Proteins und letztlich der Veränderung des AC133-Epitops resultieren könnte, welches zur Detektion verschiedener Stammzellen herangezogen wird (Kemper, Sprick et al. 2010). Mit der terminalen α 2,3-Sialylierung der CD133-N-Glykane, welche in neuronalen Stammzellen und Gliom-initiierenden Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde ein weiterer Modifikationsmechanismus des Proteins entdeckt, der funktionelle Relevanz besitzt. Desialylierung dieser Zellen mittels Neuraminidase resultierte in einer reduzierten Stabilität von CD133 und einem gesteigerten lysosomalen Abbau des Proteins (Zhou, Cui et al. 2010).

Am intrazellulären C-Terminus befinden sich zudem zwei Phosphorylierungsstellen (Tyrosin-828; Tyrosin-852). Eine wichtige Rolle bei der Übertragung der Phosphatgruppen spielen hierbei in Medulloblastomzelllinien die Src- und Fyn-Tyrosinkinase, welche *in vitro* im Gegensatz zu anderen Kinasen (Erk, MAPK, PI3K) CD133 phosphorylieren (Boivin, Labbe et al. 2009). Insbesondere die Phosphorylierung von Tyrosin-828 ist bedeutsam, da sich hierdurch eine Bindungsstelle für SH2-Domänen ergibt und es somit als Ansatzpunkt für mögliche intrazelluläre Interaktionspartner dient. Tyrosin-852, das ebenfalls phosphoryliert wird, obwohl die umliegende Aminosäuresequenz kein bisher bekanntes Erkennungsmotiv für Tyrosinkinase bietet, konnte nicht mit bekannten Sequenzmotiven für die Bindung von SH2-Domänen in Verbindung gebracht werden (Boivin, Labbe et al. 2009). Es ist aber möglicherweise dennoch von Interesse, da es in Splicevarianten mit verkürztem C-Terminus nicht vorkommt und somit zur funktionellen Diversität der Isoformen beitragen könnte.

2.6.6 Expression von CD133 in gesundem Gewebe

Nach Entdeckung des Proteins CD133 zeigte sich, dass es nicht exklusiv auf hämatopoetischen Stamm- oder Progenitorzellen zu finden ist, sondern stärker verbreitet ist. Im Verlauf der humanen embryonalen Entwicklung kann AC133 in verschiedenen epithelialen Strukturen detektiert werden. Beispielsweise in Zellen von Neuralrohr, Darm und Niere zeigt sich eine deutliche, apikale AC133-Expression (Corbeil, Roper et al. 2000).

Zwar ändert sich das Expressionsmuster von CD133 in adultem Gewebe der Maus im Vergleich zu embryonalem Gewebe, aber dennoch lässt sich CD133 in epithelialen und nicht-epithelialen Strukturen nachweisen, etwa in der Niere (Weigmann, Corbeil et al. 1997), im männlichen Reproduktionstrakt (Fargeas, Joester et al. 2004) oder in Speichel- und Tränendrüsen (Jaszai, Janich et al. 2007). Ferner exprimieren Photorezeptorzellen (Maw, Corbeil et al. 2000) und Gliazellen (Corbeil, Joester et al. 2009) CD133 in adulten Mäusen.

Tab. 2-2: Es ist eine Zusammenfassung der Untersuchungen zur mRNA-Expression und Detektion des AC133-Epitops in verschiedenen humanen Geweben dargestellt mit Unterscheidung von erfolgreichem Nachweis (+), keiner Detektion (-) und nicht erfolgter Untersuchung (n.a.; nicht angegeben) (Corbeil *et al.* 2001, Florek *et al.* 2005, Lardon *et al.* 2008).

Gewebe	Detektion von	
	CD133-mRNA	AC133-Epitop
Embryonal		
Gehirn	n.a.	+
Kolon	n.a.	+
Niere	n.a.	+
Adult		
Dünndarm	+	n.a.
Gehirn	+	-
Herz	+	-
Hoden	+	-
Knochenmark	+	+
Kolon	+	-
Leber	+	-
Lunge	+	-
Milz	-	n.a.
Niere	+	-
Pankreas	+	-/+
Plazenta	+	-
Skelettmuskulatur	(+)	-

Die Änderungen der AC133-Epitop-Detektion im humanen adulten Gewebe sind hingegen stärker ausgeprägt. So lässt sich eine AC133-Positivität nur nachweisen im Knochenmark, woraus sich auch CD34⁺ HSC isolieren lassen (Yin, Miraglia et al. 1997), oder duktalem Pankreasgewebe (Lardon, Corbeil et al. 2008), jedoch nicht in anderem epithelialen Gewebe wie Kolon oder Niere (Miraglia, Godfrey et al. 1997), wie in Tab. 2-2 dargestellt ist.

Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zur weit verbreiteten Detektion von CD133-mRNA (Miraglia, Godfrey et al. 1997; Corbeil, Roper et al. 2001; Florek, Haase et al. 2005) und des murinen CD133-Homologs. Die Diskrepanz lässt sich zumindest teilweise mit der Verwendung von Antikörpern gegen glykosylierungsabhängige Epitope, wie etwa AC133, erklären. Studien mit Antikörpern, welche unabhängig vom Glykosylierungszustand an CD133 binden, konnten Expressionsmuster in adultem Gewebe zeigen, die der Verbreitung von CD133-mRNA näher kommen (Florek, Haase et al. 2005; Karbanova, Missol-Kolka et al. 2008). Es kann also davon ausgegangen werden, dass CD133 auch beim Menschen in adultem Gewebe eine weitere Verbreitung aufweist, aber AC133 ein auf wenige Gewebe beschränktes Expressionsmuster zeigt.

2.6.7 CD133-Epitopdetektion und Evaluation von CD133 als Stammzellmarker

Die zuvor genannten Expressionsmuster stehen im Einklang mit der für AC133 propagierten Rolle als Marker für einzelne Stamm- und Progenitorzellen im ansonsten CD133⁺ Gewebe. Es ist bekannt, dass es im Differenzierungsprozess verschiedener Zellen zu einer Änderung des Glykosylierungsmusters kommt. Dies konnte beispielsweise bei Plattenepithel (Plzak, Holikova et al. 2002), in verschiedenen Krebszelllinien (Hass, Kohler et al. 1990; Malagolini, Cavallone et al. 2000) oder humanen embryonalen Stammzellen (Satomaa, Heiskanen et al. 2009) nachgewiesen werden. Auch bei CD133 kommt es im Rahmen der Differenzierung zu einer geänderten Glykosylierung, wie an hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (Hemmoranta, Satomaa et al. 2007) sowie Kolon-CSCs gezeigt wurde (Kemper, Sprick et al. 2010). Dies führt möglicherweise zu einer veränderten Tertiärstruktur und letztlich zu einer reduzierten Detektion des AC133-Epitops (Kemper, Sprick et al. 2010; Mak, Blakely et al. 2011), bei jedoch unveränderter mRNA- und Proteinexpression von CD133 (Florek, Haase et al. 2005). Eine verminderte Detektion lässt sich nicht nur für AC133 feststellen, sondern auch für Antikörper, die andere Epitope als AC133 auf der zweiten Extrazellulärschleife binden. Dies ist beispielsweise der Fall für AC141 oder 293C (Kemper, Sprick et al. 2010). Ferner berichteten Taieb *et al.*, dass im Rahmen der Differenzierung ebenfalls Epitope maskiert werden, die N-terminal lokalisiert sind. Hier konnte die Inhibition der Antikörperbindung interessanterweise mit bestimmten Gangliosiden (GM1, GD3), und nicht, wie in anderen Fällen, mit geänderter Glykosylierung in Zusammenhang gebracht werden (Taieb, Maresca et al. 2009).

In einer umfassenden Arbeit wurde von Shmelkov *et al.* demonstriert, dass CD133 im murinen Kolon eine weite Verbreitung in luminalem Epithel aufweist (Shmelkov, Butler et al. 2008). Hierzu wurde eine lacZ-reporter-Maus generiert, bei der lacZ durch die Aktivität der endogenen CD133-Promotoren gesteuert wird. Hierbei zeigten sich eine weite Verbreitung der CD133-Expression in epithelialen Strukturen und keine Beschränkung auf primitive Zellen, was auch für murine Adenokarzinome aus IL10^{-/-}/CD133^{lacZ} Mäusen und humanes Gewebe der Fall war (Shmelkov, Butler et al. 2008). Dies konnte mit dem Antikörper AC133 in einigen anderen Studien - auch mit Kolongewebe (O'Brien, Pollett et al. 2007; Ricci-Vitiani, Lombardi et al. 2007) - nicht gezeigt werden, was wiederum durch die glykosylierungsabhängige Epitopmaskierung zu erklären ist (Kemper, Sprick et al. 2010).

Trotz der uneinheitlichen Ergebnisse hinsichtlich der Verteilung von CD133 im Gewebe wird insbesondere AC133 in einer Vielzahl von Studien erfolgreich zur Identifikation primitiver Zellen, die in verschiedenen Geweben (ZNS, Prostata oder Niere) eine kleine, AC133⁺ Subpopulation umfassen, verwendet (Uchida, Buck et al. 2000; Richardson, Robson et al. 2004; Sagrinati, Netti et al. 2006). Es ist jedoch wichtig, die erwähnten Unterschiede zwischen CD133 und der Detektion des AC133-Epitops im Hinblick auf die Expression in humanem Gewebe zu bedenken.

2.6.8 CD133⁺ Stammzellen im gesunden Gewebe

In humanen embryonalen Stammzellen konnte CD133, meist in der Form des AC133-Epitops, nachgewiesen werden (Kaufman, Hanson et al. 2001; Carpenter, Rosler et al. 2003; Hoffman and Carpenter 2005). Jedoch exprimieren auch *embryoid bodies*, die im Differenzierungsprozess von embryonalen Stammzellen *in vitro* entstehen und daher schon differenzierte Zellen der drei Keimblätter beinhalten, vermehrt CD133-mRNA (Shamblott, Axelman et al. 2001; Levenberg, Golub et al. 2002). Die zeitlichen und lokalen Unterschiede der CD133-Expression in der murinen Embryonalentwicklung sind im Vergleich zur humanen Entwicklung weit besser erforscht. CD133 wird

hier als Marker für determinierte und frühe Progenitorzellen beschrieben, die von embryonalen Stammzellen abstammen und eine Koexpression mit charakteristischen Markern dieser Zellen, etwa Nestin oder Zytokeratin 18, zeigen. Im weiteren Verlauf der Differenzierung kommt es anschließend zu einer Herabregulation der CD133-Expression. Ebenso zeigen undifferenzierte Zellen der sogenannten inneren Zellmasse keine CD133-Positivität (Kania, Corbeil et al. 2005).

Initial wurde CD133 als Marker für CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen (HSC) beschrieben (Yin, Miraglia et al. 1997), die im Xenotransplantationsmodell nach Hochdosis-Bestrahlung erfolgreich das Knochenmark repopulieren (de Wynter, Buck et al. 1998), was ebenfalls mit CD133⁺/ALDH^{hi}/Lin⁻ HSCs gelingt (Hess, Wirthlin et al. 2006). Auch klinisch wurde CD133 schon für die Isolation von Stammzellen zur allogenen oder autologen Transplantation verwendet (Koehl, Zimmermann et al. 2002; Lang, Bader et al. 2004). Zusätzlich zu ihrer Funktion in der Hämatopoese zeigen CD133⁺ HSC ein weites Differenzierungspotential und können *in vitro* in endotheliale Zellen (Gehling, Ergun et al. 2000) oder neuronale Zellen (Hao, Zhao et al. 2003; Padovan, Jahn et al. 2003; Jang, Park et al. 2004) differenzieren.

Eine weitere, durch CD133 charakterisierte Population stellen neuronale Stammzellen dar. Aus fetalem Gehirn des Menschen isolierten Uchida *et al.* mittels CD133 eine Stammzellpopulation, die *in vitro* und *in vivo* Stammzeleigenschaften besitzt (Uchida, Buck et al. 2000). Dies konnte auch an Gewebe des murinen Zentralnervensystems gezeigt werden (Lee, Kessler et al. 2005; Corti, Nizzardo et al. 2007). Insbesondere konnte hier die bei neuronalen Stammzellen wichtige Tripotenz (Differenzierung in Oligodendrozyten, Astrozyten und Neuronen) *in vivo* demonstriert werden (Lee, Kessler et al. 2005). Ähnlich wie bei HSCs ist die neuronale Stammzellpopulation sehr heterogen und in mehrere Subpopulationen aufgeteilt, die durch verschiedene Marker charakterisiert werden können. So weiß man, dass im Nervensystem ein Großteil der Stammzellen kein CD133 exprimieren (Pfenninger, Roschupkina et al. 2007; Sun, Kong et al. 2009) und sich die CD133-Expression der Zellen nicht nur während der Differenzierung ändert, sondern ebenso von der Zellzyklusphase abhängt (Sun, Kong et al. 2009). Im Rahmen der Zellteilung von neuronalen Progenitorzellen konnte ein interessanter Prozess nachgewiesen werden. Es kommt hierbei zur Freisetzung von CD133⁺ Membranpartikeln, welche zur Reduktion der CD133-Oberflächenexpression führen könnte. Ob dieser Prozess als ein Ablegen von Stammzellcharakteristika während der Differenzierung angesehen werden kann oder ob die Membranpartikel beispielsweise der Signaltransduktion dienen, ist noch nicht abschließend geklärt (Dubreuil, Marzesco et al. 2007; Ettinger, Wilsch-Brauninger et al. 2011). Ein ähnlicher Mechanismus wurde auch in HSCs beobachtet, mit dem Unterschied, dass CD133 dabei in Exosomen abgegeben wird (Bauer, Wilsch-Brauninger et al. 2011).

In einer Reihe anderer Gewebe wurde CD133 ebenfalls für die Isolation von Stamm- oder Progenitorzellen herangezogen. AC133⁺/α₂β₁^{high} Stammzellen des Prostataepithels zeigen *in vitro* ein hohes Proliferationspotential und bilden *in vivo* im Beisein von Stromazellen Prostata-ähnliche Azini (Richardson, Robson et al. 2004; Vander Griend, Karthaus et al. 2008). Die Exklusivität von AC133 für Stammzellen in der Prostata wurde jedoch kürzlich in Frage gestellt (Missol-Kolka, Karbanova et al. 2011). Aus Skelettmuskulatur oder peripherem Blut isolierte CD133⁺ Stammzellen könnten therapeutischen Nutzen bei Muskeldystrophie haben, wie in ersten Studien erforscht wurde (Torrente, Belicchi et al. 2004; Meregalli, Farini et al. 2012). CD133⁺ Stammzellen aus dem Knochenmark, die nicht an der Hämatopoese beteiligt sind, stellen eine weitere Subpopulation dar, die in den Fokus der Forschung gerückt ist. Diese Zellen wurden beispielsweise erfolgreich zur Regeneration des hepatischen Gewebes in Patienten eingesetzt (Furst, Schulte am Esch et al. 2007).

Aus CD133⁺ Zellen des Knochenmarks oder der Nabelschnur können zudem mesenchymartige Stammzellen generiert werden, die selbst keine CD133-Expression mehr zeigen, aber in immundefizienten Mäusen in verschiedene nicht-hämatopoetische Gewebe differenzieren (Gregory, Prockop et al. 2005). Insbesondere bei vaskulären Erkrankungen wird damit begonnen, das regenerative Potential CD133⁺ Stammzellen zu nutzen (Stamm, Westphal et al. 2003; Burt, Loh et al. 2008). Eine weitere, mittels AC133 identifizierte Zellpopulation sind endotheliale Progenitorzellen, die in der postnatalen Vaskulogenese von Bedeutung sind – sowohl in physiologischer (endotheliale Homöostase) als auch in pathologischer (Tumervaskularisation, Ischämie) Neovaskularisation (Asahara and Kawamoto 2004; Kusumbe, Mali et al. 2009). Diese Zellen lassen sich mittels VEGFR-2, CD34 oder AC133 aus Knochenmark und Blut isolieren (Peichev, Naiyer et al. 2000). Die Oberflächenmarker zur Isolation der endothelialen Progenitorzellen sind denen der HSCs sehr ähnlich und es wird auch angenommen, dass beide Populationen von gemeinsamen Vorläuferzellen, den Hämangioblasten, abstammen (Asahara and Kawamoto 2004). In Nierengewebe konnten CD133⁺ Zellen gefunden werden, die *in vitro* typische Stammzeleigenschaften zeigen und *in vivo* an der Regeneration nach Nierenschäden beteiligt sind (Bussolati, Bruno et al. 2005; Sagrinati, Netti et al. 2006).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass CD133 bei Verwendung von Antikörpern gegen das glykosylierungsabhängige Epitop AC133 als Marker für Stamm- oder Progenitorzellen in verschiedensten Geweben eine Rolle spielt und sich mit der Isolation dieser Zellen interessante neue Ansätze mit potentieller klinischer Relevanz in der regenerativen Medizin ergeben.

2.6.9 CD133 in Krebsstammzellen solider Tumoren

Die Beurteilung, ob isolierte Zellen CSCs sind, erfolgt mittels verschiedener Experimente *in vitro* (Proliferation, Selbsterneuerungspotential, Hervorbringen von Tochterzellen mit höherem Differenzierungsgrad) und *in vivo* (Tumorinitiierungspotential, Rekapitulation der phänotypischen Heterogenität des Tumors, aus dem sie stammen). Diese Attribute konnten in einigen malignen Tumoren den CD133⁺ Subpopulationen zugeordnet werden.

In Medulloblastomen und Glioblastomen verwendeten Singh *et al.* CD133 erfolgreich für die Isolation von Krebsstammzellen. CD133⁺ Zellen aus Glioblastomen oder Medulloblastomen zeichneten sich durch Stammzeleigenschaften *in vitro* (Singh, Clarke et al. 2003) und durch eine erhöhte Tumorinitiierung nach orthotoper Transplantation in NOD/SCID-Mäuse aus. Tumoren konnten schon mit 100 injizierten CD133⁺ Zellen generiert werden und spiegelten das histopathologische Bild des Primärtumors wider. CD133⁺ Zellen zeigten auch bei Injektion von 10⁵ Zellen keine Tumorprogression trotz Überleben im Gewebe (Singh, Hawkins et al. 2004). Einige weitere Untersuchungen an Oligoastrozytomen, Glioblastomen oder Astrozytomen konnten die Funktion von CD133⁺ Zellen als CSCs in Gehirntumoren bekräftigen (Bao, Wu et al. 2006; Piccirillo, Reynolds et al. 2006; Yi, Zhou et al. 2007; Lathia, Hitomi et al. 2011), wohingegen auch konträre Ergebnisse berichtet wurden. Ogden *et al.* konnten in einigen untersuchten Hirntumoren keine CD133-Expression detektieren (Ogden, Waziri et al. 2008) und es konnte beobachtet werden, dass auch CD133⁺ Zellen CSC-Charakter *in vitro* und *in vivo* besitzen (Beier, Hau et al. 2007; Ogden, Waziri et al. 2008; Wang, Sakariassen et al. 2008). Beispielsweise zeigen CD133⁺ Gliomzellen, die den Marker für gliale Progenitorzellen A2B5 exprimieren, eine erhöhte Tumorinduktionsrate *in vivo* (Ogden, Waziri et al. 2008). Zudem unterstützt die Beobachtung, dass Temozolomid-Chemotherapie von Glioblastomzellen *in vitro* insbesondere das Wachstum von CD133⁺ Zellen inhibiert, nicht die Hypothese, dass CD133 CSCs

markiert, welche eine erhöhte Resistenz gegenüber Chemotherapie zeigen (Beier, Rohrl et al. 2008). Ferner konnte CD133-Expression bei serieller Xenotransplantation von Glioblastomen zwar nicht mit erhöhter Tumorinduktion in Verbindung gebracht werden, sehr wohl aber mit einem aggressiveren Phänotyp (Wang, Sakariassen et al. 2008).

Ebenso ist die Expression von CD133 in Kolon- oder kolorektalen Karzinomen hochvariabel (Fang, Kim et al. 2010). Mehrere Autoren beschrieben, dass CD133-Positivität ähnlich wie bei Gehirntumoren *in vitro* und *in vivo* mit CSC-Eigenschaften korreliert (O'Brien, Pollett et al. 2007; Ricci-Vitiani, Lombardi et al. 2007; Todaro, Alea et al. 2007; Haraguchi, Ohkuma et al. 2008; Vermeulen, Todaro et al. 2008; Cui, Ohuchida et al. 2010; Fang, Kim et al. 2010) und die CSC-Frequenz innerhalb der CD133⁺ Population teils um mehr als das 200fache im Vergleich zur allgemeinen Tumorzellmasse erhöht ist (O'Brien, Pollett et al. 2007). Insbesondere in Kombination mit anderen Markern (ALDH1, CD24, CD44) wurde eine vermehrte Tumorinduktion beobachtet (Haraguchi, Ohkuma et al. 2008; Vermeulen, Todaro et al. 2008; Huang, Hynes et al. 2009). Die erhöhte Tumorigenität von CD133⁺ Kolonkarzinomzellen wurde in Zusammenhang mit Interleukin-4-Produktion und damit verminderter Apoptoserate gebracht (Todaro, Alea et al. 2007). Zusätzlich kann die Interaktion mit CD10⁺ Fibroblasten *in vivo* zu einem verstärkten Wachstum führen (Cui, Ohuchida et al. 2010). *Knock-down*-Studien mittels RNA-Interferenz konnten hingegen keinen signifikanten Effekt von CD133 auf Tumorinduktionsverhalten und Proliferation feststellen (Du, Wang et al. 2008; Elsaba, Martinez-Pomares et al. 2010). *Knock-down* des postulierten CSC-Markers CD44 resultierte jedoch in einer Minderung der CSC-Eigenschaften (Du, Wang et al. 2008). Dass CD44 in einigen Kolonkarzinomen besser zur Identifikation von CSCs geeignet ist, konnte in mehreren Untersuchungen gezeigt werden (Dalerba, Dylla et al. 2007; Shmelkov, Butler et al. 2008; Chu, Clanton et al. 2009). Shmelkov *et al.* berichteten ferner, dass CD133⁻ Kolonkarzinomzellen im Rahmen von Metastasierung eine besondere Funktion zukommt, da sie im Vergleich zu CD133⁺ Zellen aggressivere Tumoren bilden und ein charakteristisches CSC-Markerprofil zeigen können (Shmelkov, Butler et al. 2008).

Auch in anderen Tumorentitäten wurde die mögliche Funktion von CD133 als CSC-Marker - mit teils kontroversen Ergebnissen - untersucht. Hierzu zählen Prostatakarzinome (Collins, Berry et al. 2005; Zhou, Wang et al. 2011), Pankreaskarzinome, Nierentumoren, Mamma- (Crocker, Goodale et al. 2009), Ovarial- (Baba, Convery et al. 2009) oder Endometriumkarzinome (Rutella, Bonanno et al. 2009), sowie Lungen- (Jiang, Collins et al. 2009), Leber- (Yin, Li et al. 2007), Magenkarzinome (Rocco, Liguori et al. 2012), verschiedene Sarkome (Jiang, Gwyne et al. 2010; Tirino, Desiderio et al. 2011), Retinoblastome (Zhong, Li et al. 2007), Melanome (Quintana, Shackleton et al. 2008) oder Kopf-Hals-Tumoren (Chiou, Yu et al. 2008; Zhang, Shi et al. 2010). In letzteren konnte ein Zusammenhang zwischen CD133 und Src-Kinasen gezeigt werden, welche eine wichtige Funktion in der epithelial-mesenchymalen Transition spielen. Zudem korrelierte eine Verminderung der CD133-Expression mit einer Reduktion von Stammzeleigenschaften *in vitro* und *in vivo* (Chen, Wu et al. 2011).

Zwar wurde CD133 in vielen Untersuchungen erfolgreich zur Identifikation von CSCs verwendet, wie zuvor dargelegt wurde, es bestehen jedoch große Unterschiede zwischen den verschiedenen Tumorentitäten und insbesondere zwischen einzelnen Patienten. Dieses interindividuell hochvariable CD133-Expressionsmuster hat zur Folge, dass CD133 nicht in allen Tumoren gleichermaßen zur Detektion von Subpopulationen mit gesteigerten Stammzeleigenschaften geeignet ist. Wodurch diese Unterschiede zustande kommen, ist bisher nicht eindeutig geklärt. Zunächst spielt die zuvor erwähnte glykosylierungsabhängige CD133-Detektion eine Rolle (Kemper, Sprick et al. 2010). Darüber hinaus wurden Kreuzreaktionen des Antikörpers AC141 mit Zytokeratin 18 beschrieben

(Potgens, Schmitz et al. 2002), sowie das Vorhandensein verkürzter CD133-Varianten, die durch den häufig verwendeten Antikörper AC133 nicht erkannt werden (Osmond, Broadley et al. 2010). Zudem wird vermutet, dass auch die Ursprungszelle des malignen Wachstums eine Rolle spielt. In Glioblastom-CSCs wurden beispielsweise Genexpressionsprofile beschrieben, die als Ursprungszelle fetale oder adulte Stammzellen vermuten lassen und in der Ausprägung unterschiedlicher CSC-Phänotypen und CD133-Expressionsmuster resultieren (Lottaz, Beier et al. 2010). Daher ist es unwahrscheinlich, dass ein einzelner Oberflächenmarker zur Identifikation der CSC-Subpopulationen in verschiedenen Tumoren ausreicht, sondern vielmehr eine Kombination mehrerer Marker zu einer besseren Anreicherung Tumor-initiierender Zellen führt.

2.6.10 Klinische Auswirkungen von CD133-Expression in Tumoren

Wie in einigen klinischen Studien beobachtet wurde, korreliert die Expression von CD133 in verschiedenen Tumorentitäten mit wichtigen Parametern wie dem Gesamtüberleben, krankheits- und progressionsfreiem Überleben oder auch Therapieresistenz.

Beispielsweise ist eine erhöhte CD133-Proteinexpression ein unabhängiger prognostischer Marker für signifikant schlechteres Gesamtüberleben in kolorektalen Karzinomen (Horst, Kriegl et al. 2008). Ein schlechteres Gesamtüberleben konnte auch bei Patienten mit CD133⁺ Tumoren und zusätzlicher Expression der Marker Oct-4 oder β -catenin beobachtet werden (Horst, Kriegl et al. 2009; Ong, Kim et al. 2010). In Verbindung mit CD24-Positivität ergibt sich hingegen eine Korrelation mit Invasivität und Differenzierungsgrad (Choi, Lee et al. 2009). Gliome, die vermehrt CD133-Protein exprimieren, zeigen ebenfalls eine inverse Korrelation zwischen CD133-Expression und progressionsfreiem Überleben sowie Gesamtüberleben (Zeppernick, Ahmadi et al. 2008). In oligodendroglialen Tumoren ist CD133-Expression ein besserer Indikator für schlechtes Gesamtüberleben und den klinischen Verlauf als das histologische Grading (Beier, Wischhusen et al. 2008). Bei Rezidiven von Glioblastomen wurde ein Anstieg der CD133-Expression um das 4-6fache im Vergleich zu Primärtumoren entdeckt. Verstärkte CD133-Expression ging jedoch interessanterweise mit signifikant besserem Überleben nach dem Rezidiv einher (Pallini, Ricci-Vitiani et al. 2011). Auch in anderen Tumoren dient CD133 als prognostischer Marker, etwa in Mammakarzinomen, in denen CD133 mit Tumorgroße, Stadium und lymphatischer Metastasierung korreliert und schlechtes Gesamtüberleben und krankheitsfreies Überleben anzeigt (Zhao, Lu et al. 2011). Ähnliche Ergebnisse, insbesondere hinsichtlich des Einflusses von CD133 auf das Gesamtüberleben, finden sich auch für Nierenzellkarzinome (Costa, Rocha et al. 2012), HCC (Song, Li et al. 2008), Pankreas- (Maeda, Shinchi et al. 2008), Magenkarzinome (Ishigami, Ueno et al. 2010), Neuroblastome (Sartelet, Imbriglio et al. 2012) und Kopf-Hals-Tumoren (Canis, Lechner et al. 2012). Dennoch ist CD133 nicht immer mit negativen Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf verbunden. Mehrere Studien konnten keinen Einfluss von CD133 ausmachen, etwa in Melanomen (Piras, Perra et al. 2010) oder als alleiniger Marker in NSCLC (Salnikov, Gladkich et al. 2010). In Kombination mit ABCG2 hat CD133 jedoch prädiktiven Wert hinsichtlich Rezidiven in NSCLC in Stadium I (Li, Zeng et al. 2011).

Neben der CD133-Proteinexpression ist mittlerweile auch der Nachweis von mRNA in den Fokus klinischer Studien gerückt, die zeigen konnten, dass beispielsweise aus Kolonkarzinomen isolierte mRNA als Marker für rezidivfreies Überleben und Gesamtüberleben verwendet werden kann (Artells, Moreno et al. 2010). In Glioblastomen ergab sich ein Zusammenhang zwischen CD133-mRNA-Expression und progressionsfreiem Überleben sowie Gesamtüberleben (Metellus, Nanni-Metellus et al. 2011).

2.6.11 Zusammenhang zwischen CD133-Expression in Tumoren und Therapieresistenz

Eine mögliche Erklärung für die Assoziation von CD133-Positivität mit schlechterer Prognose ist eine erhöhte Therapieresistenz, die insbesondere CSCs, und damit in einigen Krebsarten CD133⁺ Zellen zugesprochen wird. Eine erhöhte Therapieresistenz einzelner Tumorzellen kann letztlich zu schneller Tumorprogression oder erhöhter Rezidivrate nach Therapie und in der Folge schlechterem Überleben führen (Dean, Fojo et al. 2005).

Eine erhöhte Resistenz von CD133⁺ Zellen gegenüber Radio- oder Chemotherapie wurde in mehreren Tumorarten beobachtet. Hierzu zählen beispielsweise Gehirntumoren (Bao, Wu et al. 2006; Liu, Yuan et al. 2006), Kolonkarzinome (Ong, Kim et al. 2010), nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome (Chen, Hsu et al. 2008; Salnikov, Gladkich et al. 2010), HCC (Ma, Lee et al. 2008), orale Plattenepithelkarzinome (Zhang, Shi et al. 2010) oder Neuroblastome (Sartelet, Imbriglio et al. 2012).

Prinzipiell kommen für eine erhöhte Therapieresistenz verschiedene Mechanismen in Frage, etwa die Expression bestimmter *ATP-binding cassette transporter*, erhöhte DNA-Reparaturkapazität oder verstärkte Resistenz gegenüber Apoptose (Dean, Fojo et al. 2005). Einige dieser Mechanismen wurden in CD133⁺ Zellen nachgewiesen. Bao et al. konnten beobachten, dass die CD133⁺ Subpopulation in Glioblastomen nach Bestrahlung vergrößert ist und im Xenotransplantationsmodell eine Anreicherung dieser Zellen um das 3-5fache nach Bestrahlung erfolgt, die nicht durch vermehrte CD133-Expression, sondern durch erhöhte Resistenz von CD133⁺ Zellen zustande kommt. Grund hierfür ist eine erhöhte Aktivität von Kontrollpunkt-Proteinen (Chk1/2), die bei DNA-Schädigung einen Zellzyklusarrest zur Reparatur dieser Schäden einleiten (Bao, Wu et al. 2006). In einer anderen Studie wurde zudem eine höhere Genexpression des DNA-Reparaturproteins MGMT im Vergleich zu weniger resistenten CD133⁻ Zellen gefunden (Liu, Yuan et al. 2006). Darüber hinaus war in derselben CD133⁺ Zellpopulation BCRP1 überexprimiert, welches in die Gruppe der *ATP-binding cassette transporter* gehört, die eine erhöhte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika vermitteln. Ein weiterer Vertreter dieser Proteinfamilie, ABCB5, führt in CD133⁺ malignen Melanomzellen zu einer reversiblen Resistenz gegenüber Doxorubicin (Frank, Margaryan et al. 2005). Eine Überexpression von ABCG2 kennzeichnet hingegen vermehrt Chemotherapie-resistente CD133⁺ NSCLC-Zellen (Chen, Hsu et al. 2008). Ein weiterer wichtiger Mechanismus, der Zellen einen Überlebensvorteil bietet, insbesondere unter Selektionsbedingungen wie Chemo- oder Radiotherapie, ist die erhöhte Resistenz gegenüber Apoptose. Die Regulation pro- und antiapoptotischer Faktoren spielt hierbei eine wichtige Rolle. TRAIL kann beispielsweise den extrinsischen Apoptosewegs induzieren, wohingegen FLIP zu einer Inhibition führt. In manchen CD133⁺ Krebszellen ist FLIP verstärkt exprimiert, was zu erhöhter Resistenz gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose führt. Herunterregulation von FLIP hingegen resultiert in verstärkter Sensitivierung gegenüber TRAIL (Zobalova, Stantic et al. 2008). In einer Medulloblastom-CSC-Population mit erhöhter CD133-Expression konnte eine erhöhte Resistenz gegenüber TRAIL sowie ionisierender Strahlung festgestellt werden, was mit einer verstärkten Expression antiapoptotischer Gene (c-FLIP, Caspase 8, Bcl-2, Bax) einherging (Yu, Chiou et al. 2010). Auch in CD133⁺ Glioblastomzellen wurde eine erhöhte Genexpression verschiedener Proteine, die an der Inhibition von Apoptose beteiligt sind, entdeckt (Liu, Yuan et al. 2006). In CSCs aus Kolonkarzinomen konnte wiederum ein durch Interleukin-4 vermittelter, antiapoptotischer Effekt beobachtet werden, der im Zusammenhang mit erhöhter Resistenz gegenüber zytotoxischen Effekten steht (Todaro, Perez Alea et al. 2008).

Diese Mechanismen bieten einen plausiblen Erklärungsansatz für die Assoziation von CD133⁺ Zellen mit schlechterem Überleben. Die molekularen Zusammenhänge der Therapieresistenz von CD133⁺ Zellen sind insbesondere in Gehirntumoren gut erforscht, dennoch bleibt die Frage offen, ob CD133 nur als Marker von CSCs und damit für Zellen mit erhöhter Therapieresistenz fungiert oder selbst funktionelle Relevanz besitzt. Einen Hinweis auf eine mögliche Funktion von CD133 liefern in diesem Zusammenhang Angelastro *et al.*, die in Gliomzellen aus Ratten ektopisch CD133 überexprimierten und eine erhöhte Resistenz gegen Camptothecin und Doxorubicin beobachteten, welche wiederum mit gesteigerter Expression des *ATP-binding cassette Transporters* ABCB1 einherging (Angelastro and Lame 2010).

2.6.12 Überblick über mögliche Funktionen von CD133 in gesunden und malignen Zellen

Trotz intensiver Forschung konnten bisher noch keine eindeutigen Funktionen des Proteins CD133 oder Signaltransduktionswege gefunden werden, an denen es beteiligt ist. Dennoch gibt es einige Bereiche auf zellulärer Ebene und in der Zell-Zell-Interaktion, in denen CD133 funktionell wichtig zu sein scheint.

Zunächst ist bekannt, dass CD133 unabhängig vom Zelltyp in Microvilli und Membranprotrusionen lokalisiert ist (Corbeil, Roper *et al.* 2000) und dort in *lipid rafts* spezifisch an Cholesterol bindet (Roper, Corbeil *et al.* 2000). Zudem wurden Interaktionen mit GM1-Gangliosiden, die ebenfalls Bestandteil der Mikrodomänen und mit CD133 kolokalisiert sind (Janich and Corbeil 2007), im N-terminalen Bereich von CD133 beschrieben (Taieb, Maresca *et al.* 2009). Es ist jedoch bisher unklar, ob CD133 in diesen Domänen aktiv an Prozessen wie Signaltransduktion, Zell-Zell-Interaktionen oder beispielsweise Organisation der Membranprotrusionen beteiligt ist.

Für letzteres spricht die Beobachtung, dass CD133 für die Biogenese membranöser Scheiben in Photorezeptorzellen (Stäbchen) des Auges essentiell ist (Jaszai, Fargeas *et al.* 2007). Eine *frameshift*-Mutation im CD133-Gen, die einen verfrühten Translationsabbruch und damit ein verkürztes CD133-Protein zur Folge hat, führt zu retinaler Degeneration (Maw, Corbeil *et al.* 2000). Andere Mutationen im CD133-Gen haben ebenfalls diesen Effekt (Zhang, Zulfiqar *et al.* 2007; Yang, Chen *et al.* 2008). Yang *et al.* stellten in transgenen Mausmodellen mit humanem mutierten und Wildtyp-CD133 und *Pcdh21*^{-/-}-Mäusen fest, dass CD133 direkt mit PCDH21 (Photorezeptor-spezifisches Cadherin) interagiert und dass diese Interaktion für die korrekte Lokalisation beider Proteine innerhalb der Photorezeptorzelle und damit für die Organisation der Membranprotrusionen essentiell ist. Darüber hinaus interagierte CD133 in den Photorezeptoren mit Actin (Yang, Chen *et al.* 2008). Mittels eines *Prom1*^{-/-}-Mausmodells wurde gezeigt, dass es in Abwesenheit von CD133 zu einer progredienten Degeneration von retinalen Stäbchen und Zapfen kommt, jedoch keine anderen Auffälligkeiten auftraten, die auf eine spezifische Funktion von CD133 hinweisen (Zacchigna, Oh *et al.* 2009).

Eine potentielle funktionelle Relevanz von CD133 im Rahmen von Signaltransduktion oder Zell-Zell-Interaktion wird beispielsweise durch die Beobachtung gestützt, dass von einigen Zellen Membranpartikel freigesetzt werden, die vermehrt CD133 beinhalten. Diese Vesikel werden entweder als Exosome (Bauer, Wilsch-Brauninger *et al.* 2011) freigesetzt oder als Prominosome, die eine eigenständige Art von Partikeln darstellen und sich von Exosomen durch die fehlende CD63-Immunreaktivität unterscheiden (Marzesco, Janich *et al.* 2005). Die von HSCs insbesondere während der Differenzierung freigesetzten CD133-Exosomen werden anschließend von mesenchymalen Stammzellen aufgenommen (Bauer, Wilsch-Brauninger *et al.* 2011). Auch bei Caco-2-Zellen wurde eine vermehrte Freisetzung von Prominosomen während der Differenzierung beobachtet (Marzesco,

Janich et al. 2005). Ob diese Vesikel, ähnlich wie Exosomen (Simons and Raposo 2009), jedoch tatsächlich an Zell-Zell-Kommunikation beteiligt sind und ob CD133 hierbei eine Rolle spielt, ist bisher nicht geklärt. Bemerkenswert ist, dass Entzug von Cholesterol aus der Plasmamembran zu einer verstärkten Vesikelfreisetzung führt und deutliche Veränderungen in der Ultrastruktur von Microvilli hervorruft (Marzesco, Wilsch-Brauninger et al. 2009). Möglicherweise spielt hier also das Cholesterol-bindende CD133 eine funktionelle Rolle.

Nachdem CD133 zur Anreicherung verschiedener Stammzellpopulationen in normalem oder malignem Gewebe verwendet wird, liegt es nahe, anzunehmen, dass CD133 hierbei etwa beim Erhalt von Funktion und Phänotyp einer primitiven Zelle funktionell wichtig ist, zumal die Expression des AC133-Epitops im Rahmen der Zelldifferenzierung vermindert wird. Ähnlich wie bei Stammzellen in gesundem Gewebe wird vermutet, dass CSCs bevorzugt in sogenannten Stammzellnischen lokalisiert sind und dort mit den umgebenden Zellen des TME interagieren (Gilbertson and Rich 2007). Insbesondere für CD133⁺/nestin⁺ Zellen aus Gehirntumoren konnte gezeigt werden, dass sie in einer perivaskulären Nische zu finden sind, wo sie spezifisch mit Endothelzellen interagieren. CD133⁻ Zellen zeigen diese Eigenschaft nicht (Calabrese, Poppleton et al. 2007). Möglicherweise ist also CD133 an diesen Interaktionen, die bei Koinjektion von CD133⁺ CSCs mit Endothelzellen *in vivo* zu einer verstärkten Tumorentstehung führen (Calabrese, Poppleton et al. 2007), beteiligt. Ein weiterer Hinweis, dass CD133 bei der Interaktion mit Endothelzellen und Neovaskularisation funktionelle Relevanz besitzen könnte, ist die Beobachtung, dass Hypoxie Einfluss auf die Expression von CD133 in einigen Tumorentitäten besitzt (Soeda, Park et al. 2009; Hashimoto, Shimizu et al. 2011; Sun, Song et al. 2012). Zunächst ist CD133 insbesondere in hypoxischen Tumorbereichen in Glioblastomen lokalisiert, wie die Kolo-kalisation mit HIF2 α belegt (Li, Bao et al. 2009). Darüber hinaus wird CD133 unter hypoxischen Bedingungen, durch HIF1 α -Expression vermittelt, verstärkt exprimiert. Knockdown von HIF1 α sowie Inhibition der PI3K/Akt oder ERK1/2 Signalwege resultierten in einer verminderten Regulation von CD133 durch Hypoxie (Soeda, Park et al. 2009). Nachdem CD133⁺ Glioblastomzellen zudem für Angiogenese wichtiges VEGF vermehrt freisetzen (Bao, Wu et al. 2006), ist eine aktive Beteiligung von CD133 an der Neovaskularisation von Tumoren durchaus vorstellbar. Die positive Regulation der CD133-Expression durch Hypoxie und HIF1 α lässt sich jedoch nicht verallgemeinern, da etwa in Magen- oder Kolonkarzinomen eine inverse Korrelation zwischen CD133 und HIF1 α beobachtet wurde (Matsumoto, Arao et al. 2009). In Lungenkarzinomzelllinien konnte kürzlich zudem nachgewiesen werden, dass OCT-4 und SOX-2 essentiell für die HIF1 α /2 α -bedingte Expressionssteigerung von CD133 sind (Iida, Suzuki et al. 2012).

Ob die präferentielle Lokalisation von CD133⁺ Tumorzellen in hypoxischen Nischen mit einer erhöhten Apoptoseresistenz und damit verbesserten Überlebenschancen in diesen Tumorbereichen zusammenhängt, ist bisher nicht geklärt. Es ist jedoch bekannt, dass CD133⁺ Zellen häufig mit verminderten Apoptoseraten unter zellulärem Stress wie Radio- oder Chemotherapie assoziiert sind (siehe 2.6.11). An der Vermittlung von erhöhter Therapieresistenz in CD133⁺ Zellen sind verschiedene Signaltransduktionswege beteiligt. Über den PI3K/Akt-Signalweg beispielsweise kommt es in CD133⁺ Zellen aus HCCs oder Glioblastomen zur Aktivierung von Resistenzmechanismen. Hierbei wurde eine vermehrte Expression von antiapoptotischen Faktoren (Ma, Lee et al. 2008) oder von *ATP-binding cassette Transportern* (Bleau, Hambarzumyan et al. 2009) nachgewiesen. Auch CD133 selbst kommt als Zielgen dieses Signalwegs in Frage, da in Gliomen die Inhibition der PI3K/Akt oder ERK1/2 Signalwege die CD133-Expansion unter Hypoxie einschränkt (Soeda, Park et al. 2009). Ferner wurde beobachtet, dass in kolorektalen Tumoren mit erhöhter Aktivierung des Ras-Raf-MEK-ERK-Signalwegs

ebenso CD133 vermehrt exprimiert wird. Dies ist möglicherweise ein Hinweis dafür, dass die Regulation der CD133-Expression diesem Signalweg unterliegt (Kemper, Versloot et al. 2012).

Die einzige, bisher in Versuchen nachgewiesene Interaktion mit anderen Proteinen, die eine klare funktionelle Relevanz von CD133 demonstriert, konnte erst kürzlich in Kopf-/Halstumoren gefunden werden. Chen *et al.* zeigten, dass CD133 über direkte Interaktionen mit Src zu verstärkter epithelial-mesenchymaler Transition führen kann. Src, eine non-Rezeptor Tyrosinkinase, wird durch Interaktion mit Membranrezeptoren aktiviert und leitet über Aktivierung von Ras/MAPK-, PI3K/Akt-, und STAT3-Signalkaskaden letztlich eine verstärkte EMT ein. Interessanterweise wurde Src zuvor als intrazellulärer Bindungspartner von CD133 beschrieben, der CD133 zudem phosphorylieren kann (Boivin, Labbe et al. 2009). Es konnte demonstriert werden, dass Überexpression von CD133 zu einer vermehrten Phosphorylierung und damit Aktivierung von Src führt. Die Folge ist eine erhöhte Tumorigenität und Expression von Stammzeleigenschaften (Chen, Wu et al. 2011). Unterstützt werden diese Ergebnisse von der Beobachtung, dass CD133-Expression in Pankreaskarzinomzellen, die ein hohes Migrations- und Invasionspotential besitzen, reversiblen Einfluss auf die Expression von EMT-Markern und die Ausprägung von EMT-Eigenschaften hat (Ding, Yoshimitsu et al. 2012).

2.7 Zielsetzung

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Ausprägung und subzelluläre Lokalisation von CD133 in Tumoren und gesundem Gewebe immer besser charakterisiert wurde, jedoch die tatsächlichen Funktionen des Proteins CD133 und dessen Expressionsregulation noch weitgehend unklar sind. Dies liegt zum Teil sicherlich daran, dass die Regulation und Expression von CD133 kein gewebeübergreifend einheitliches Muster ergeben, sondern sehr gewebspezifisch und oftmals interindividuell verschieden sind. Die Charakterisierung von CD133⁺ Zellen erfolgte bisher zudem fast ausschließlich im Zusammenhang mit Krebsstammzellen, obwohl die Ergebnisse zu CD133 als CSC-Marker teils inkonsistent sind und nicht abschließend geklärt ist, ob CD133 in diesen Zellen allein als Markerprotein auftritt oder für die Ausprägung des CSC-Phänotyps von funktioneller Relevanz ist. Daher erscheint es sinnvoll, die Auswirkungen einer CD133-Expression unabhängig von der Rolle als Stammzellmarker zu beleuchten, zumal sich CSCs von differenzierten Tumorzellen nicht nur in der Expression von CD133 unterscheiden, sondern beispielsweise auch eine andere epigenetische Regulation aufweisen. Somit könnte die Regulation anderer Gene einen dominanten Effekt über CD133 ausüben und dadurch die eigentlichen Auswirkungen von CD133 auf die Zelle verdecken.

Die Fragestellungen dieser Arbeit waren folglich:

- Wie ist die endogene CD133-Expression in verschiedenen Karzinomzelllinien sowie in HEK293-Zellen auf mRNA- und Proteinebene charakterisiert?
- Welche Effekte hat ektopisch exprimiertes CD133 auf primär nicht tumorigene HEK293-Zellen hinsichtlich Zellmorphologie, Proliferationsverhalten, Migration oder Zellzyklusverteilung *in vitro* und welche Unterschiede lassen sich *in vivo* in Bezug auf Tumorigenität in NOD/SCID-Mäusen feststellen?
- Welche Auswirkungen hat ektopisch exprimiertes CD133 auf die Genexpression von HEK293-Zellen? Lassen sich mögliche, hierdurch hervorgerufene Unterschiede im Transkriptom an transient transfizierten Zellen nachvollziehen und ergeben sich daraus möglicherweise Hinweise auf eine funktionelle Relevanz von CD133 in diesen Zellen?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Chemikalien

Tab. 3-1: Verwendete Chemikalien

Artikel	Hersteller
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Acrylamid, Protogel ultra pure	Schröder Diagnostics, Stuttgart
Agarose	SERVA GmbH, Heidelberg
Aminoethylcarbazol	Vector Laboratories, Burlingame, CA (USA)
Ammoniumperoxodisulfat	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA (USA)
Anorganische Säuren, Salze, Basen	Merck KGaA, Darmstadt
Azeton	Merck KGaA, Darmstadt
Bromphenolblau	SERVA GmbH, Heidelberg
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Dimethylpimelimidat (DMP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Biochrom AG, Berlin
DMEM/Ham's F-12	Biochrom AG, Berlin
Eagle's Minimum Essential Medium (MEM), Modified	ATCC, Manassas, VA (USA)
ECL Blotting Substrat	PIERCE, Rockford, IL (USA)
Einbettmedium Tissue-Tek® OCT™ Compound	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn (NL)
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanolamin	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck KGaA, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
FACS Flow	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
G418 Sulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt

Immobilon Western Chemiluminescent HRP	Millipore, Bedford, MA (USA)
Substrate	
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Kaisers Glyzeringelatine	Merck KGaA, Darmstadt
Lösungsmittel, Alkohole	Merck KGaA, Darmstadt
Matrigel „Basement Membrane Matrix“	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Mayer's Hämalun-Lösung	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Nocodazol	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt
PBS-Tabletten	Gibco BRL, Karlsruhe
PCR-Reagenzien	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Penicillin-Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Plasmocin	InvivoGen, San Diego, CA (USA)
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Proteinase Inhibitor Cocktail Complete	Roche GmbH, Mannheim
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Transfektionsreagenz „MATra-A“	IBA GmbH, Göttingen
Triethanolamin (TEA)	Merck KGaA, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Merck KGaA, Darmstadt
Triton-X 100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Trypanblau	Biochrom AG, Berlin
Trypsin	Biochrom AG, Berlin
Tween	SERVA GmbH, Heidelberg
VectaMount™ Mounting Medium	Vector Laboratories, Burlingame, CA (USA)
Xylencyanol FF	AppliChem GmbH, Darmstadt
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 3-2: Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
3 MM Whatman-Papier	Bender & Hobein GmbH, München
Einwegpipetten	Corning, Inc., Corning, NY (USA)

FACS-Röhrchen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Buckinghamshire (UK)
Immobilon-P Membran (0,45µm)	Millipore, Bedford, MA (USA)
Immobilon-PSQ Membran (0,2µm)	Millipore, Bedford, MA (USA)
Kanülen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Kryoröhrchen	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Objektträger „SuperFrost® Plus“	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Parafilm M	American National Can, Menasha, WI (USA)
Pipettenspitzen	Gilson, Inc., Middleton, WI (USA)
Pipettenspitzen (gestopft)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Reagenzreservoir	Corning, Inc., Corning, NY (USA)
Röhrchen, steril, Zellkultur 15ml	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Röhrchen, steril, Zellkultur 50ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Skalpelle	PFM Medical AG, Köln
Spritzen 2 / 5 / 10ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterilfilter	Millipore, Bedford, MA (USA)
Zellkultureinsätze mit Porenmembran	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Zellkulturflaschen und -schalen	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Zellkultur-Multiloch-Platten	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Zentrifugengefäße 1,5 / 2ml	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifugengefäße 1,5ml (nucleasefrei)	Corning, Inc., Corning, NY (USA)

3.1.3 Geräte

Tab. 3-3: Zur Anwendung gekommene Geräte

Artikel	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese-Dokumentation	Cybertech, Berlin
Agarosegel-Elektrophoresekammern	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Blotting-Kammer	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA (USA)
Cryocut Leica CM1900	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Durchflusszytometer „FACSCalibur“	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Elektrophorese-Netzteil „PowerPac 200“	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA (USA)
ELISA-Reader „Elx800“	Bio-Tek Instruments, Winooski, VT (USA)
Filmentwicklungskammer	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Filmentwicklungsmaschine „Curix 60“	Agfa Healthcare GmbH, Berlin
Gefrierschrank (-20°C, -80°C)	Liebherr GmbH, Ochsenhausen

Glaswaren Schott	DURAN Glastechnik GmbH & Co. KG, Mainz
Inkubator für Zellkultur, CO ₂ -begast	Binder GmbH, Tuttlingen
Kühlschrank (4°C)	Liebherr GmbH, Ochsenhausen
Magnetplatte „96 Magnet Bar Plate“	IBA GmbH, Göttingen
Magnetrührer mit Heizblock „IKAMAG REO“	IKA-Works, Inc., Wilmington, NC (USA)
Mikroliter-Pipetten	Abimed GmbH, Langenfeld
Mikrowelle	Electrolux Hausgeräte Vertriebs GmbH
Phasenkontrastmikroskop „Standard 25“	Carl Zeiss AG, Jena
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipettierhilfe „Easypet“	Eppendorf AG, Hamburg
Präzisionswaage „CP 4202 S“	Sartorius AG, Göttingen
Rollenmischer RM5	CAT, Staufen
Schüttelinkubatoren „2Certomat“	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sicherheitswerkbank Klasse II	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Spektralphotometer „GeneQuant Pro“	Pharmacia GmbH, Erlangen
Stickstoff-Kühllagereinrichtung	Messer Cryotherm GmbH, Kirchen/Sieg
Thermocycler „RoboCycler Gradient 96“	Stratagene, La Jolla, CA (USA)
Thermocycler „UNO“	Biometra GmbH, Göttingen
Thermomixer „Comfort“	Eppendorf AG, Hamburg
Vortex Mixer „Reax1“	IKA-Works, Inc., Wilmington, NC (USA)
Wasserbad „13a“	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Zählkammer „Fuchs-Rosenthal“	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Zentrifuge „5415 R“	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge „Rotanta 46 R“	Sorvall GmbH, Bad Homburg

3.1.4 Kits, Standards und Enzyme

Tab. 3-4: Verwendete Kits

Artikel	Hersteller
Avidin-Biotin-PO Komplex (Vectastain®)	Vector Laboratories, Burlingame, CA (USA)
BCA Protein Assay	Pierce, Rockford, IL (USA)
DNA QIAshredder	Qiagen GmbH, Hilden
Nuclear-ID® Green Cell Cycle Kit for Flow Cytometry	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach
PNGase F Kit	New England Biolabs, Ipswich, MA (USA)
Reverse Transcription System	Promega, Madison, WI (USA)

RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden

Tab. 3-5: Standards

Standards	Hersteller
Gene Ruler 1 Kb DNA Ladder	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Gene Ruler 50bp DNA Ladder	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Proteingrößenstandard „Benchmark“	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Tab. 3-6: Enzyme

Enzyme	Hersteller
Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex	Vector Lab Inc., Burlingame, CA (USA)
PNGase F	New England Biolabs, Ipswich, MA (USA)
Reverse Transkriptase	Promega, Madison, WI (USA)
RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden
Taq-Polymerase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

3.1.5 Antikörper

Tab. 3-7: Verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller	Anwendung
Primärantikörper		
Actin	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA (USA)	WB
CD133 (C24B9)	Cell Signaling, Danvers, MA (USA)	WB
CD133/1 (AC133)	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach	FACS, WB, ICC, IHC
CD133/1 (W6B3C1)	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach	FACS, WB
CD44s	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg	IHC
CD44v6	Novocastra, Newcastle upon Tyne (GB)	IHC
EpCAM (HO.3)	Trion Research, München	IHC
IgG1 (Isotypenkontrolle)	Dako GmbH, Hamburg	ICC, IHC
IgG2a (Isotypenkontrolle) (murines Myelom)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	FACS
Ki67	Dako GmbH, Hamburg	IHC
Sekundärantikörper		
IgG/HRP (Kaninchen α Ziege)	Dako GmbH, Hamburg	WB
IgG/HRP (Ziege α Maus)	Dako GmbH, Hamburg	WB
IgG/HRP (Ziege α Kaninchen)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte	WB

IgG1-FITC (Ziege α Maus)	Southern Biotech, Birmingham, AL (USA)	FACS
IgG/ABC-PO (Pferd α Maus)	Vector Laboratories, Burlingame, CA (USA)	ICC, IHC

3.1.6 Oligonukleotidprimer

Tab. 3-8: Aufgelistet sind sämtliche, in dieser Arbeit zur Anwendung gekommenen Oligonukleotidprimer. Die Synthesisierung der Oligonukleotide erfolgte durch die Firma Metabion GmbH, Martinsried.

Gen	Produkt-länge (bp)	FW Primer (5' → 3')	BW Primer (5' → 3')
BACE2	362	GTGGCAGGAACCCCGCACTC	GGCAAGCCGGCTCCACACAT
BAI3	310	GAGGGCTGCCTGACCCAGGA	ATGGGCCGCTGCAGTGTGTC
CARD9	300	GCTGAAGCTCAGGCACGCCA	GCCAGGCACTGCAGCTCGAA
CD133	194	TGGGGCTGCTGTTTATTATTCT	TGCCACAAAACCATAGAAGATG
CELF2	236	CGCAGGCCCTGTTCTGCCTC	ATCTCGGGCCAGAGGGGCTG
CLEC3A	368	GCTCAGCAGGCTTGCCCCAG	TGGAGGGCGTTGATTCGTCGG
CNN2	269	GGAGGCCGGCTACTGAGGCT	GCAGGGACCCTCGCCCTACA
DECR1	227	CTGTGGCCTCGCTCCTCGGA	TCCGGCTGGCTATCACGCAC
DUSP5	206	AGATCCTGCCCTCCACGCCC	GCAGGATGTGGCCGTTGCCA
FERMT1	286	TTTGCAGGCGAGTCCGAGGT	CATCGGGCACAACCTTCGCAGC
GAPDH	258	TGTCGCTGTTGAAGTCAGAGGAGA	AGAACATCATCCCTGCCTCTACTG
GATA2	212	GGGACCCTGTCTGCAACGCC	GTGTCCAGCCAGGGCAGCTG
KLF11	368	TTGTTGCCCTTGCCCCTGC	TCTGCCTGCCAGCCTGGGAT
NEOMYCIN-R	405	CAGGGGCGCCCGTTCTTTT	CGCCTTGAGCCTGGCGAACA
NOTCH1	477	TTGGCGTGAGCTCAGCAGCC	ACAGAGCGCACACAGACGCC
OVOL2	312	TCGGTCCGCAGCTGGGATGA	AACCACCGAGTCGCTGCACG
RBP7	511	CCGCCGACCTCAGCGGTACT	TCCAGCCACGAGTCCTCGTCG
RUNX3	502	GCTGGAGGCGGGGACCCTAA	GGTGGGGGTGGGGGACACTT
SHISA2	308	ACAATGACCGCCAGCAGGGC	GGCGCTGGAGCTGGAAGTGG
SOHLH2	300	AGCTCCTCTGCTGGGAGGC	GGCTTCAGCTCCTCGGCAC
SYK	349	CCACTGTGGCCAGCACGAGG	GATGCCACCAGGGCAGCCTG
ZNF420	279	GGGCTGGCGAACCCGAAATTGG	TCTGAGCAGAGTCCAGGCATTCC
ZNF91	736	CTTTTGCCAGAGCAGAGCATGGAA	AGCAAGGGTTGAAGAACGGCTAAA

3.1.7 Plasmide

Als Vektor für Transfektionen kam das Plasmid pCR3.1-Uni zur Anwendung (CMV-Promotor, SV40 Promotor, Kanamycin/Neomycin-Resistenz). Es wurde einerseits ein Leervektor (pCR3.1-Uni- \emptyset) und andererseits ein pCR3.1-Uni-CD133-Vektor verwendet.

3.1.8 Zelllinien

Tab. 3-9: Verwendete Zelllinien

Zelllinien	Herkunft	Referenz/Beschreibung
Caco-2	Kolon-Karzinom	ATCC HTB-37
FaDu	Hypopharynx-Karzinom	ATCC HTB-43
HCT-8	Kolon-Karzinom	ATCC CCL-244
HEK293	Embryonale Nierenzelllinie	Graham <i>et al.</i> 1977
HEK293-CD133 ^{high 1}	Embryonale Nierenzelllinie	Transfektion mit Vektor pCR3.1-Uni-CD133
HEK293-CD133 ^{low 2}	Embryonale Nierenzelllinie	Transfektion mit Vektor pCR3.1-Uni-CD133
HEK293-CD133 ^{transfiziert}	Embryonale Nierenzelllinie	Transfektion mit Vektor pCR3.1-Uni-CD133
HEK293-Ø	Embryonale Nierenzelllinie	Transfektion mit Vektor pCR3.1-Uni-Ø
HeLa	Zervix-Karzinom	ATCC CCL-2
HeLa-CD133 ^{transfiziert}	Zervix-Karzinom	Transfektion mit Vektor pCR3.1-Uni-CD133
HeLa-Ø	Zervix-Karzinom	Transfektion mit Vektor pCR3.1-Uni-Ø
OSC-19	Metastasiertes Zungenkarzinom	Yokoi <i>et al.</i> 1988
PCI-1	Larynx-Karzinom	Heo <i>et al.</i> 1989

3.1.9 Dienstleistungen

Tab. 3-10: In Anspruch genommene Dienstleistungen

Dienstleistungen	Anbieter
Microarray-Genexpressionsanalyse	IMGM Laboratories GmbH, Martinsried
Oligonukleotidsynthese	Metabion GmbH, Martinsried

¹ Durchflusszytometrisch sortiert aus HEK293-CD133^{transfiziert} hinsichtlich hoher CD133-Expression

² Durchflusszytometrisch sortiert aus HEK293-CD133^{transfiziert} hinsichtlich niedriger CD133-Expression

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Sämtliche Zellkulturarbeiten fanden unter einer Sicherheitswerkbank unter Zuhilfenahme steriler Arbeitsgeräte und Lösungen statt. Die Kultivierung der adhärenenten Zellen erfolgte in einem Inkubator mit 5% CO₂-Partialdruck bei einer Temperatur von 37°C und einer konstanten Luftfeuchtigkeit von 95%. Hierbei wurden den Anforderungen der Zellen angepasste Kulturmedien verwendet. Waschschrte erfolgten mit PBS-Lösung und Zentrifugationsschritte, wenn nicht anders angegeben, bei 280g für 5 Minuten. Alle 2-3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel, wobei die Zellen zunächst gewaschen, anschließend mit 0,05% Trypsin/0,02% EDTA gelöst und 1:10 mit frischem Medium resuspendiert wurden.

Das Einfrieren von Zellsuspensionen (10⁵-10⁷ Zellen pro Kryoröhrchen) erfolgte in speziellem Einfriermedium. Um ein zu schnelles Einfrieren zu verhindern, wurden die Kryoröhrchen zunächst in einen Isopropanolbehälter im Gefrierschrank (-80°C) gegeben. Die Lagerung erfolgte anschließend im Gefrierschrank bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff bei -196°C. Zum Auftauen der Zellen wurde die Suspension rasch auf 37°C gebracht, zentrifugiert, und in frischem Medium resuspendiert, um den DMSO-Gehalt zu minimieren. Ein erster Mediumwechsel erfolgte nach 24 Stunden.

Zur Generierung von Zelllysaten wurden Zellsuspensionen mit etwa 10⁷ Zellen gewaschen und zentrifugiert. Daraufhin wurde das Zellpellet in 30-80µl Lysispuffer resuspendiert und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 16100g für 10 Minuten. Anschließend konnte die Proteinbestimmung im Überstand mittels BCA-Test (BCA Protein Assay) nach Angaben des Herstellers durchgeführt und das Lysat weiter prozessiert werden.

Medium für HEK293, HCT-8, HeLa, FaDu, PCI-1:	DMEM, 10% FCS, 1% Penicillin (100U/ml)/Streptomycin (100µg/ml), Plasmocin (2,5µg/ml)
Medium für Caco-2:	EMEM, 20% FCS, 1% Penicillin (100U/ml)/Streptomycin (100µg/ml), Plasmocin (2,5µg/ml)
Medium für OSC-19:	DMEM/Ham's F-12 (1:1), 10% FCS, 1% Penicillin (100U/ml)/Streptomycin (100µg/ml), Plasmocin (2,5µg/ml)
Einfriermedium:	50% Medium, 40% FCS, 10% DMSO
PBS-Lösung:	8,0g NaCl, 0,2g KCl, 1,42g Na ₂ HPO ₄ , 0,24g KH ₂ PO ₄ in 1l H ₂ O; pH 7,4
Lysispuffer:	PBS pH 7,4; 1% Triton-X 100; Protease Inhibitor Cocktail Complete (2 Tabletten/50ml)

3.2.1.2 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung in Einzelzellsuspensionen wurde mithilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer durchgeführt. Dazu wurden 20µl einer 1:1-Mischung von Zellsuspension und 0,1%iger Trypanblaulösung (in PBS) in die wiederverwendbare Kammer gegeben und danach unter dem Mikroskop die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt, welche sich von den toten Zellen durch die fehlende Aufnahme von Trypanblau unterscheiden. Dadurch kommt es zu einer schwach blauen Färbung der lebenden Zellen und einer charakteristischen, tiefblauen Färbung der toten Zellen. Abschließend wurde die Gesamtzellzahl in der Suspension durch folgende Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl}_{\text{Probe}} [\text{ml}] = \frac{\text{Zellzahl}_{\text{Kammer}} \cdot 1000}{\text{Fläche}_{\text{Kammer}} [\text{mm}^2] \cdot \text{Tiefe}_{\text{Kammer}} [\text{mm}] \cdot \text{Verdünnungsfaktor}}$$

$$\begin{aligned} \text{Fläche}_{\text{Kammer}} &= 16 \text{ mm}^2 \\ \text{Tiefe}_{\text{Kammer}} &= 0,2 \text{ mm} \\ \text{Verdünnungsfaktor} &= 0,5 \end{aligned}$$

Die Proliferationsrate von Zellen wurde über einen Zeitraum von 4 Tagen bestimmt. Hierzu wurden jeweils $3 \cdot 10^5$ Zellen mit 2ml Medium in 6-Lochplatten ausplattiert und über den gewünschten Zeitraum täglich die Anzahl der Zellen in einem der Ansätze ermittelt.

3.2.1.3 Transfektion von Zellen

Zur Generierung stabil oder transient transfizierter Zellen wurde die Methode der Magnet-assistierten Transfektion gewählt. Zunächst wurde eine Zellsuspension mit $3 \cdot 10^5$ Zellen/2ml Medium in 6-Lochplatten ausplattiert. Hierfür wurden die Zellen zunächst gewaschen, mittels Trypsin gelöst, zentrifugiert, in Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Nach einer Inkubationsperiode von 24 Stunden in einer Multilochplatte wurde das Medium gewechselt und durch 1,5ml Medium und 0,5ml Transfektionsansatz ersetzt. Der Transfektionsansatz beinhaltete serumfreies Medium, das entsprechende Transfektionsplasmid und Transfektionsreagenz. Es folgte eine 15-minütige Inkubationszeit auf einer Magnetplatte, um das Einbringen der an das ferromagnetische Reagenz gekoppelten Plasmide in die Zellen zu ermöglichen. Anschließend wurde der Transfektionsansatz durch Standardmedium ersetzt. Zum Erhalt stabil transfizierter Zelllinien wurde nach weiteren 24 Stunden Inkubationszeit G418 (Neomycin)-Selektionsmedium (1,25mg/ml) zugegeben.

3.2.1.4 Boyden-Kammer – Migration und Chemotaxis

Um Informationen über das Migrationsverhalten und Chemotaxis von Zellen zu erhalten, wurden Boyden-Kammern (Becton Dickinson GmbH) verwendet. Der Boden dieser Kammern besteht aus einer für Zellen permeablen Membran aus Polyethylenterephthalat (PET) mit einer Porengröße von $8,0 \mu\text{m}$. Zellen, welche zuvor über Nacht in Medium mit Zusatz von 0,1% FCS inkubiert worden waren, wurden ausgezählt und $2,5 \cdot 10^5$ Zellen in 2ml serumfreiem Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde anschließend in die Boyden-Kammern gegeben, welche in 6-Lochplatten platziert waren. In den 6-Lochplatten selbst befanden sich 2,5ml Medium mit 10% FCS. Nach 5 Stunden oder 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Kammern entfernt, 3-5 Mal vorsichtig mit PBS gewaschen und anschließend 2 Minuten mit Methanol fixiert. Es folgte ein erneuter Waschschrift mit PBS und letztlich die Färbung mit Trypanblaulösung (1:3-Mischung mit PBS) für 20 Minuten. Überschüssiges Trypanblau wurde mit destilliertem Wasser abgewaschen und die Membran von der Kammer gelöst. Nach Einbetten mit Kaisers Glyzeringelatine auf einem Objektträger wurden die Präparate unter dem Mikroskop analysiert.

3.2.1.5 Scratch assay – Migration

Der *scratch assay* stellt eine weitere einfache Möglichkeit dar, Migrationseigenschaften zu beurteilen, bietet jedoch nicht die Möglichkeit, einen chemischen Gradienten anzulegen. Für dieses Experiment wurden Zellen in Zellkulturschalen bis zur Konfluenz der Zellschicht inkubiert und anschließend mit einer 200µl-Pipettenspitze ein artifizieller Riss durch die Zellschicht erzeugt. Im Anschluss daran erfolgte die Beobachtung der Zellen über einen Zeitraum von zwei Tagen hinsichtlich der Fähigkeit, in die geschaffene Lücke zu migrieren.

3.2.1.6 Zellzyklusverteilung

Zur Analyse der Zellzyklusverteilung wurde das Nuclear-ID[®] Green Cell Cycle Kit for Flow Cytometry (Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach) verwendet. Hierbei wurden jeweils $1 \cdot 10^6$ Zellen in 10ml Medium in Zellkulturschalen ausgesät. Nach 2 Tagen Wachstum in der logarithmischen Phase wurde das Medium mit 10% FCS durch Medium mit 0,1% oder 10% FCS ersetzt. Daran schloss sich eine weitere Inkubation der Zellen für 22 Stunden an. Über den gleichen Zeitraum erfolgte zusätzlich die Inkubation der Negativkontrolle mit DMSO (1µl/10ml Medium) und der Positivkontrolle mit Nocodazol (1µl/10ml Medium). Nocodazol führt durch Interaktionen mit Mikrotubuli zu einem Zellzyklusarrest in der G₂/M-Phase (Jordan, Thrower et al. 1992). Nach erneuter Supplementierung mit 10% FCS wurden die Zellen nach 30 Minuten respektive 10 Stunden mittels Trypsin aus den Zellkulturschalen gelöst, in Medium resuspendiert und zentrifugiert. Darauf folgende Waschschritte und Ethanolfixierung wurden nach Protokoll des Herstellers ausgeführt.

3.2.2 Durchflusszytometrische Messung

3.2.2.1 Bestimmung der Oberflächenproteinexpression und Zellsortierung

Die membranständige Expression des Proteins CD133 wurde nach Bindung eines spezifischen Primärantikörpers mithilfe eines fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers an einem FACSCalibur[™]-Gerät (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) ausgeführt.

Als Fluoreszenzfarbstoff kam Fluorescein Isothiocyanat (FITC) zur Anwendung, welches ein Absorptions- und Emissionsmaximum bei Wellenlängen von etwa 495nm beziehungsweise 521nm aufweist.

Für das Anfärben der Zellen musste eine Einzelzellsuspension hergestellt werden, welche in der Folge zweimal mit 500µl PBS gewaschen wurde. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem Primärantikörper und der passenden Isotypenkontrolle (Verdünnung jeweils 1:50) in 50µl FACS-Puffer für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Nach einem weiteren Waschschritt mit FACS-Puffer wurden Probe sowie Isotypenkontrolle für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert. Auf einen erneuten Waschschritt folgte die Resuspension in 400µl FACS-Puffer und die Zugabe von 2µl Propidiumiodid (PI; 0,5mg/ml PBS), um bei der durchflusszytometrischen Messung eine Unterscheidung von vitalen und toten Zellen zu ermöglichen. Sollten die Zellen nach der FACS-Analyse erneut kultiviert werden, wurden sämtliche Arbeitsschritte unter der Sicherheitswerkbank und mit gestopften Pipettenspitzen durchgeführt. In diesem Fall wurde ebenfalls auf die Zugabe von Propidiumiodid verzichtet.

Die Auswertung der Messergebnisse hinsichtlich Granularität (SSC, *side scatter*) und Zellgröße (FSC, *forward scatter*) wurde mit der Software Cell Quest[™] (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) vorgenommen. Zusätzlich wurde die mittlere Fluoreszenz der vitalen Zellen berechnet und in Relation zur Fluoreszenz der Isotypenkontrolle gesetzt.

Beim Sortieren von Zellen, die anschließend weiterkultiviert wurden, kam das Gerät FACS Aria[™] II (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) zum Einsatz. Die Auswertung der Messergebnisse und die Auswahl der zu sortierenden Subpopulationen von Zellen wurden mit der Software FACSDiva[™] (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) ausgeführt.

FACS-Puffer: PBS, 3%FCS

3.2.2.2 Messung der Zellzyklusverteilung

Die durchflusszytometrische Analyse der in Ethanol fixierten Zellen erfolgte mittels des Farbstoffes NuclearID™ Green (Absorptionsmaximum 488nm, Emissionsmaximum 530nm) über den Kanal FL1/Green. Anhand des Färbemusters konnte der prozentuale Anteil der Zellen bestimmt werden, welche sich in G₁-, S- oder G₂/M-Phase des Zellzyklus befinden. Eine genaue Unterscheidung zwischen Zellen in der G₂- oder M-Phase ist mittels konventioneller 1D-Durchflusszytometrie nicht möglich. Für die Auswertung wurde die Software FlowJo 7.6.1 (TreeStar, Inc., Ashland, OR (USA)) herangezogen.

3.2.3 Proteinbiochemische Analyseverfahren

3.2.3.1 Quantitative Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration von Zelllysaten wurde das BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL (USA)) nach Angaben des Herstellers verwendet und die Farbreaktion im ELISA-Reader bei 540nm detektiert. Als Vergleichsstandard diente bovines Serumalbumin (BSA).

3.2.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blotting

Proteinexpressionmuster verschiedener Zellen wurden durch Western Blotting analysiert. Hierzu wurden 30µg Gesamtprotein zur Auflösung von Sekundär- und Tertiärstruktur mit 5µl Laemmli-Puffer versetzt und für 3 Minuten auf 95°C erhitzt, um anschließend auf das Acrylamidgel übertragen zu werden. Es kamen 10-15%ige SDS-Polyacrylamidgele in Laufpuffer zum Einsatz. Die elektrophoretische Auftrennung (SDS-PAGE) nach Proteingröße erfolgte nach einem Standardprogramm (Fokussierung bei 15mA/180V für 15 Minuten, Auftrennung bei 30mA/180V), zusammen mit dem definierten Proteingrößenstandard *benchmark* (Invitrogen, Karlsruhe). Im Anschluss daran wurden die Proteine bei 100V und 500mA für 45 Minuten auf eine mit Methanol aktivierte Immobilon-P Membran (Porengröße 0,45µm) übertragen. Um unspezifische freie Bindungsstellen der Membran zu blockieren, wurde die Membran für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Milchlösung inkubiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über eine Stunde in 1:1000-Verdünnung mit BSA-Lösung. Daran schlossen sich drei 5-minütige Waschschrte mit Waschpuffer an, bevor die Membran mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert wurde (Verdünnung 1:5000 mit Milchlösung, 1 Stunde Inkubationsdauer). Nach drei weiteren Waschschrten wurde die Chemilumineszenzreaktion durch ECL Blotting Substrat (PIERCE, Rockford, IL (USA)) oder Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrat (Millipore, Bedford, MA (USA)) gestartet. Die Detektion erfolgte auf Hyperfilm ECL (GE Healthcare, Buckinghamshire (UK)) über einen Zeitraum von 30 Sekunden bis 30 Minuten. Als Entwicklungsmaschine kam das Gerät Curix 60 (Agfa Healthcare GmbH, Berlin) zum Einsatz.

Um eine erneute Inkubation der Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) mit einem weiteren spezifischen Antikörper zu ermöglichen wurden die Membranen 25 Minuten mit Stripping-Puffer gewaschen. Durch das enthaltene SDS und den niedrigen pH wurden die zuvor gebundenen Antikörper gelöst. Nach drei Waschschrten und einer erneuten Inkubation für 30 Minuten mit Milchlösung konnte die Inkubation mit einem weiteren Primärantikörper nach obiger Beschreibung begonnen werden.

SDS-Polyacrylamidgel:	Sammelgel (4%):	30% Acrylamid; 2M Tris pH 6,8; 0,5M EDTA
	Trenngel (10-15%):	30% Acrylamid; 2M Tris pH 8,9; 0,5M EDTA

Laemmli-puffer:	140mM Tris-HCl pH 7,0, 30% Glycerin, 4% SDS, 16% Mercaptoethanol, 0,1% Bromphenolblau
Laufpuffer (10x):	250mM Tris, 2M Glycin, 1% SDS
Blottingpuffer (10x):	250mM Tris, 1,26M Glycin
Blockpuffer:	5% Magermilchpulver in Waschpuffer
Waschpuffer:	PBS mit 0,2% Tween
BSA-Lösung:	3% BSA in Waschpuffer
Stripping-Puffer:	0,2M Tris, 1% SDS, pH 2,5

3.2.3.3 Enzymatische Deglykosylierung durch PNGase F

Zur Analyse der Proteinglykosylierung wurde Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F; New England Biolabs, Ipswich, MA (USA)) herangezogen. PNGase F weist die Fähigkeit auf, die meisten N-glykosidisch an Asparaginreste gebundenen Zuckerreste abzuspalten (Abb. 3-1) (Maley, Trimble et al. 1989).

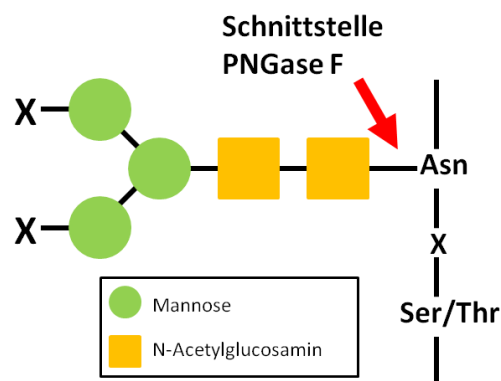


Abb. 3-1: Darstellung der Schnittstelle des Enzyms PNGase F zwischen Asparagin-Rest (Asn) des Proteins und Kohlenhydrat-Kette.

Die Deglykosylierung wurde mit 10µg Gesamtprotein aus Zelllysate nach Angaben des Herstellers ausgeführt. Nach anschließender Erhitzung auf 95°C mit 4µl Laemmli-Puffer erfolgten SDS-PAGE und Western Blotting nach obiger Beschreibung.

3.2.4 Molekularbiologische Analyseverfahren

3.2.4.1 RNA-Extraktion, quantitative RNA-Bestimmung und Generierung von cDNA

Als erster Schritt zum Nachweis bestimmter mRNA-Transkripte wurden Zellen mithilfe des Kits DNA QIAshredder (Qiagen GmbH, Hilden) lysiert und aus dem Lysat in der Folge die RNA isoliert. Hierbei kam das RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden) zur Anwendung. Zusätzlich zur RNA-Extraktion erfolgte ein DNA-Verdau mit DNase I (Qiagen GmbH, Hilden). Mittels PCR wurde die RNA-Probe anschließend auf das Vorhandensein genomischer DNA geprüft.

Die RNA-Konzentration wurde mit 98µl 10mM Tris und 2µl Probe in einem Spektralphotometer bestimmt. Jeweils 1µg RNA wurde mittels des Reverse Transcription Systems (Promega, Madison, WI (USA)) in komplementäre cDNA umgeschrieben. Im letzten Schritt erfolgte die Amplifikation der gewonnenen cDNA in einer Polymerase-Kettenreaktion mit spezifischen Primerpaaren, um mRNA-Expressionslevels evaluieren zu können.

3.2.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR dient der Vervielfältigung spezifischer DNA-Abschnitte, um die Expressionslevels verschiedener Gene untersuchen zu können. Bei jedem Versuchsansatz wurden zusätzlich eine Probe ohne Zugabe von cDNA (Kontrolle auf DNA-Verunreinigung der Reagenzien), eine Probe der Ausgangs-RNA (Kontrolle des erfolgreichen DNase-Verdaus) sowie eine cDNA-Probe analysiert. Hierbei wurden spezifische Primer für den Nachweis einer GAPDH-cDNA-Sequenz verwendet. Das Enzym GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) ist ein ubiquitäres Protein mit einem relativ stabilen Genexpressionslevel, weshalb es hier als Ladekontrolle herangezogen wurde.

Die Analyse erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 20µl mit folgenden Substanzen:

- **Taq-Puffer (10x) mit KCl:** 2µl
- **dNTPs (2mM):** 2µl
- **MgCl₂ (25mM):** 2µl
- **Primer sense (1-100µM):** 1µl
- **Primer antisense (1-100µM):** 1µl
- **Taq-Polymerase (1U/µl):** 1µl
- **cDNA-Probe:** 1-5µl
- **H₂O:** entsprechende Differenz zu Reaktionsvolumen von 20µl

Die Amplifikation der DNA gliedert sich in verschiedene Reaktionsschritte. An die initiale Denaturierungsphase von 10 Minuten schlossen sich 20-35 Zyklen, welche jeweils aus drei Schritten zu je 30 Sekunden bestanden:

- Denaturierung bei 95°C
- Primerhybridisierung bei 52-62°C (optimale *Annealing*-Temperatur abhängig von Primer)
- Elongation bei 72°C

Abschließend erfolgten eine verlängerte Elongationsphase von 10min und das rasche Abkühlen der Proben auf 4°C bis zur weiteren Prozessierung. Die größenabhängige Auftrennung der amplifizierten DNA-Stränge wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierbei kamen Gele mit 1-3% Agarose in 1x TBE-Laufpuffer (Tris-Borat-EDTA) zum Einsatz. Die Spannung zwischen den Elektroden betrug 3-5V/cm. Zur Visualisierung der Nukleinsäurebanden unter UV-Licht wurden die Gele mit Ethidiumbromid (0,75µg/ml) versetzt.

- DNA-Laufpuffer (1x TBE):** 45mM Tris-Borat, 1mM EDTA
- Agarose-Gel:** Agarose (1-3%) in 1xTBE
- Ladepuffer (6x):** 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol FF, 30% Glycerin in Wasser

3.2.5 Xenotransplantationsmodell

Um das Tumorinduktionsverhalten von HEK293-Transfektanten *in vivo* zu beurteilen, wurden 6 Wochen alten, ausschließlich männlichen NOD/SCID-Mäusen Zellsuspensionen subkutan injiziert. Die Haltung der Mäuse erfolgte in den Tierställen des Walter-Brendel-Instituts für chirurgische Forschung (München). Zellen wurden zunächst mit Trypsin aus den Zellkulturflaschen gelöst, gezählt und in definierten Zellzahlen ($5 \cdot 10^3$, $1 \cdot 10^5$ und $5 \cdot 10^6$) in 100µl DMEM resuspendiert und mit 100µl Matrigel (*basement membrane matrix*) (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) vermischt, um eine bessere

Lokalisation der Zellen im Tier zu erhalten. Die Injektion erfolgte jeweils subkutan in die linke und rechte Flanke. Nach 21 respektive 36 Tagen wurden die Tiere mittels CO₂-Gas getötet und präpariert. Die entnommenen Tumoren wurden mit einer Präzisionswaage gewogen und rasch in Einbettmedium in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.2.6 Histologische und immunhistochemische Analyseverfahren

3.2.6.1 Vorbereitung und Fixierung der Präparate

Zur weiteren Analyse der entnommenen Tumorpräparate wurden in einem Gefriermikrotom Gewebsschnitte mit einer Schnittdicke von 4µm auf silanisierten SuperFrost® Plus-Objektträgern (Fisher Scientific GmbH, Schwerte) angefertigt.

Die Schnitte wurden nach Lufttrocknung und Azetonfixierung für 5 Minuten bei -25°C gelagert. Nach dem Auftauen erfolgte eine erneute Fixierung mit Azeton und anschließend eine Rehydrierung in PBS-Lösung für 10 Minuten.

Für immunzytochemische Analysen wurden zunächst $5 \cdot 10^5$ Zellen in Einzelzellsuspension gebracht. Nach zwei Waschschritten mit PBS wurden die Zellen in 200µl PBS resuspendiert und durch eine Zytospin-Zentrifuge (800 rpm für 5 Minuten) auf Objektträger aufgebracht. Nach Lufttrocknung erfolgte die Fixierung der Zellen mit Azeton für 5 Minuten und die Weiterverarbeitung der Präparate in Analogie zu den Gewebsschnitten.

3.2.6.2 Immunhistochemische und immunzytochemische Färbung

Zunächst erfolgte eine Inaktivierung der endogenen Peroxidase im Gewebe durch Inkubation mit einer 0,3%igen Wasserstoffperoxidlösung (in PBS) für 10 Minuten. Zur Vermeidung unspezifischer Bindung des Primärantikörpers wurden die Präparate für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Normalserum (1:100) inkubiert. Um Hintergrundfärbungen durch endogenes Biotin zu minimieren, wurde zusätzlich 100µl Avidin-D-Lösung pro 1ml Normalserum verwendet. Es kam jeweils Serum des Tieres, in dem der Zweitantikörper produziert wurde, zur Anwendung. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit spezifischen Primärantikörpern in Verdünnungen von 1:100-1:4000 bei 4°C über Nacht. Es schlossen sich zwei Waschschrritte mit PBS/Triton (Konzentration 0,1%) an sowie die Inkubation mit entsprechenden biotinylierten Sekundärantikörpern für eine Stunde bei Raumtemperatur. In nächsten Schritt folgte nach weiteren zwei Waschschrritten mit PBS die Bindung der Peroxidase mittels der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode. Zur spezifischen Detektion und Visualisierung der Antigen-Antikörper-Komplexe wurde das Chromogen Aminoethylcarbazol (AEC) verwendet, welches nach zwei PBS-Waschschrritten zugegeben wurde. Durch Peroxidaseaktivität kommt es dabei in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid zu einer Umwandlung von AEC in ein rotbraunes Präzipitat. Zudem wurden jeweils Negativkontrollen der Präparate mit entsprechender IgG-Isotypenkontrolle anstelle des Primärantikörpers angefertigt. Abschließend wurden die Zellkerne mit Mayer's Hämatoxylin gegengefärbt, mit Kaisers Glyzeringelatine eingedeckelt und unter dem Mikroskop analysiert.

3.2.6.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Azeton-fixierte Schnitte wurden für 6 Minuten in Hämatoxylin-Lösung gefärbt und anschließend für 10 Minuten unter fließendem Wasser gebläut. Es schloss sich eine Färbung mit Eosin für etwa 3

Minuten an und die Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, 100%). Zuletzt wurden die Schnitte für 5 Minuten in Xylol geklärt und eingedeckelt.

3.2.7 Microarray-Genexpressionsanalyse

Die Durchführung der Genexpressionsanalyse wurde bei IMG M Laboratories GmbH (Martinsried) in Auftrag gegeben. Es erfolgte zunächst eine Bestimmung der Konzentration und des Reinheitsgrades, sowie eine Integritätskontrolle. Im Anschluss daran wurde die Microarray-Hybridisierung auf einem Agilent Sure Print G3 Human Gene Expression Microarray (8x60K Format) der Firma Agilent Technologies durchgeführt. Die statistische Analyse der Rohdaten und die Auswertung hinsichtlich regulierter Genexpressionsmuster mittels PANTHER-Analyse (<http://www.pantherdb.org/>) wurde ebenfalls von IMG M übernommen. Zur Auswahl potentieller Zielgene wurde als Schwellenwert eine minimale Genregulation um das Zweifache in Relation zum Vergleichswert festgelegt (*fold change* ≥ 2). Hierdurch ergab sich eine Auswahl von 118 signifikant in ihrer Expression veränderter Gene, von welchen wiederum eine Auswahl mittels RT-PCR weiter untersucht wurde.

4 Ergebnisse

4.1 CD133-Expression in verschiedenen Karzinomzelllinien und HEK293-Wildtypen

In einem ersten Schritt erfolgte die Untersuchung verschiedener etablierter Karzinomzelllinien sowie von HEK293-Zellen hinsichtlich ihrer CD133-Expression. Es wurden Zelllinien aus Kopf-Hals-Tumoren, Kolon- und Zervixkarzinomen verwendet. Zunächst wurde die Proteinexpression von CD133 auf der Zelloberfläche mittels durchflusszytometrischer Messung evaluiert. Hierbei fand der Primärantikörper AC133 (Miltenyi) Anwendung sowie eine passende murine Isotypenkontrolle (IgG2a). Die Darstellung der CD133-Antigendetektion in Histogrammen zeigte für die Zelllinien FaDu, HeLa, OSC-19 und PCI-1 nahezu deckungsgleiche Verteilungen mit den Isotypenkontrollen (Abb. 4-1). Folglich ergaben sich bei der Berechnung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) pro Einzelzelle keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit dem AC133-Primärantikörper behandelten Proben und den entsprechenden Kontrollen und die MFI lag jeweils nahe am Referenzwert 1 der Isotypenkontrolle (MFI zwischen $0,96 \pm 0,05$ und $1,02 \pm 0,03$), wie die Tabelle in Abb. 4-1 zeigt. Caco-2-Zellen, von denen bekannt ist, dass sie CD133 exprimieren (Corbeil, Roper et al. 2001), demonstrierten hingegen eine starke CD133-Positivität, wie im Histogramm deutlich wird. Dementsprechend war die MFI mit $69,40 \pm 17,66$ erhöht im Vergleich zum Referenzwert 1. HEK293-Zellen zeigten eine im Vergleich zur Isotypenkontrolle signifikant erhöhte Detektion ($p < 0,05$) bei Verwendung des AC133-Antikörper in der Durchflusszytometrie, welche sich in einer MFI von $3,02 \pm 0,51$ widerspiegelte. Eine proteinbiochemische Detektion von CD133 in SDS-Gelelektrophorese und Western Blot gelang in HEK293-Zellen mit dem C24B9-Antikörper (Cell Signaling) jedoch nicht, wie in Abb. 4-2 (A) dargestellt ist.

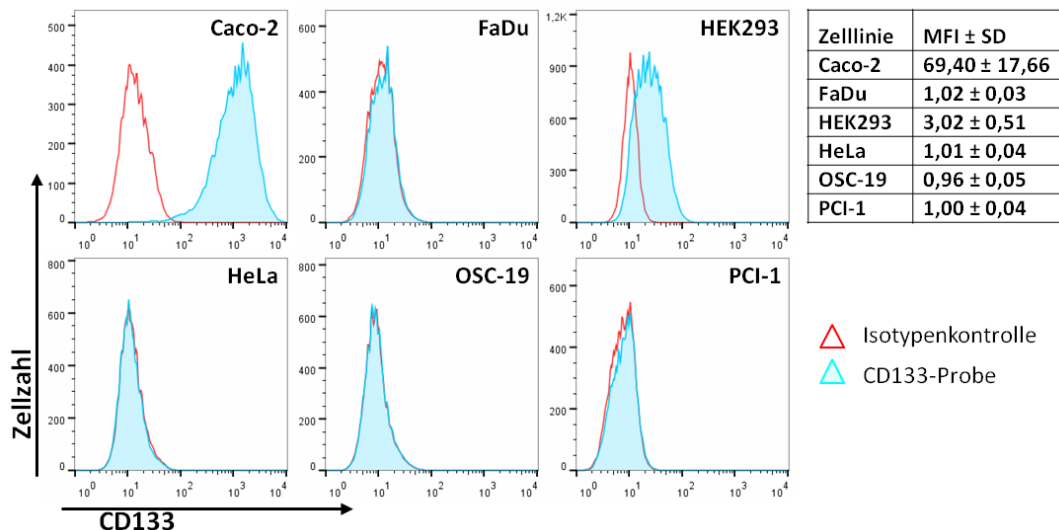


Abb. 4-1: CD133-Proteinexpression in Wildtyp-Karzinomzelllinien und HEK293-Zellen.

Die CD133-Expressionsmuster der verschiedenen Zelllinien wurden durchflusszytometrisch evaluiert. Dargestellt ist für jede Zelllinie jeweils ein repräsentatives Histogramm mit Isotypenkontrolle (rote Kurve) sowie Detektion von CD133-Antigen (blaue Kurve). Die Detektion erfolgte mittels AC133 (Miltenyi) und IgG2a (Isotypenkontrolle) als Primärantikörper und entsprechendem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper. Zur quantitativen Beurteilung der CD133-Expression wurde in drei unabhängigen Versuchsansätzen die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) berechnet, welche jeweils mit Standardabweichung (SD) angegeben ist.

Auch in Zelllysaten von PCI-1 und OSC-19 ließ sich proteinbiochemisch keine Detektion des AC133-Epitops feststellen. In Caco-2-Zelllysaten war wiederum, entsprechend den Ergebnissen der

durchflusszytometrischen Messungen, eine starke AC133-Detektion zwischen einem Molekulargewicht von 95kD und 120kD zu verzeichnen, was dem zu erwartenden Bereich zwischen dem Molekulargewicht des unglykosyliertem und stark glykosyliertem CD133-Protein entspricht.

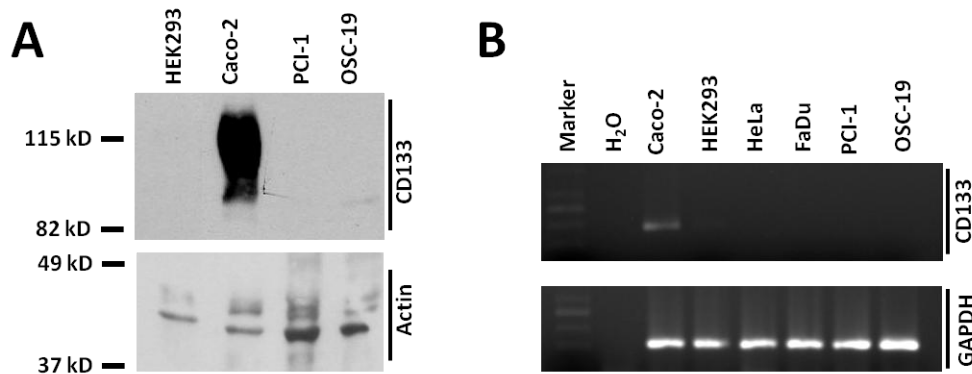


Abb. 4-2: Expression von CD133 auf Protein- und mRNA-Ebene in Wildtyp-Karzinomzelllinien und HEK293-Zellen.

(A) Proteinbiochemische Detektion von CD133 in Zelllysaten von Wildtypzellen mittels C24B9-Antikörper (Cell Signaling) und HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper. Die Visualisierung erfolgte mit ECL und als Ladekontrolle wurde Actin herangezogen. **(B)** Aufgetragen ist das Ergebnis einer RT-PCR mit Agarose-Gelelektrophorese zur Beurteilung der mRNA-Expression von CD133. Ergänzend ist eine Ladekontrolle mit GAPDH dargestellt.

Zur Beurteilung der Expression von CD133 auf mRNA-Ebene wurde nach Isolierung von mRNA und Umschreiben in cDNA eine RT-PCR mit Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Abb. 4-2 (B) zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung. In Caco-2-Zellen wurde hierbei CD133-Expression auf mRNA-Ebene nachgewiesen, wie es zuvor schon in Western Blot und Durchflusszytometrie auf Proteinebene der Fall war. Für HeLa, FaDu, PCI-1 und OSC-19 konnte keine Expression von CD133-mRNA gezeigt werden. In HEK293-Zellen, welche durchflusszytometrisch eine erhöhte MFI aufwiesen, konnte kein Nachweis einer CD133-mRNA-Transkription erbracht werden, was sich auch bei einer Erhöhung der Zahl der PCR-Amplifikationszyklen von 27 auf 35 nicht änderte (Daten nicht gezeigt).

4.2 Magnet-assistierte Transfektion von Karzinomzelllinien

Das nächste Ziel war es, stabile Transfektanten von Karzinomzelllinien mit CD133 zu etablieren. Hierzu wurden die Vektoren pCR3.1-Uni-Ø und pCR3.1-Uni-CD133 in einem Magnet-assistierten Transfektionssystem verwendet, welches eine hohe Transfektionseffizienz bei geringer Zelltoxizität ermöglicht (Plank, Anton et al. 2003). Als Zelllinien dienten FaDu und PCI-1 aus Kopf-Hals-Tumoren, welche als Wildtypzellen proteinbiochemisch oder durchflusszytometrisch keine detektierbare Expression des AC133-Epitops zeigten. Ebenfalls konnte in diesen Zellen vor Transfektion keine CD133-Expression auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (siehe 4.1). Im Anschluss an die Transfektion erfolgte eine Selektion der Zellen mittels Neomycin. Sobald die überlebenden Zellen die logarithmische Phase des Zellwachstums erreichten, wurde eine durchflusszytometrische Beurteilung der Transfektionseffizienz vorgenommen. Hierbei zeigte sich, dass nur ein geringer Anteil der Zellen CD133 stark exprimierte. Der prozentuale Anteil dieser Zellen lag bei FaDu-Zellen bei maximal 4,3% und bei PCI-1-Zellen bei maximal 8,1% am zweiten Tag nach Transfektion. Diese initiale CD133-Positivität verringerte sich im weiteren Verlauf (spätestens bis 60 Tage nach Transfektion) auf Expressionswerte der entsprechenden Wildtypzellen, wie Abb. 4-3 (A) für PCI-1-Zellen zeigt. Dies wurde beobachtet, obwohl der eukaryozide Selektionsdruck zur Expression des Neomycin-

Resistenzgens aufrechterhalten wurde und die Zellen hierunter stabile Proliferationsraten zeigten und keine morphologischen Veränderungen sichtbar wurden.

Daher wurden die CD133-transfizierten Zellen im Folgenden hinsichtlich der korrekten Expression des Transfektionsplasmids untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass - auch im Fall von bereits nicht mehr detektierbarer CD133-Proteinexpression - CD133-mRNA nachzuweisen war, wie in Abb. 4-3 (B) exemplarisch an transfizierten PCI-1-Zellen dargestellt ist. Es konnte gezeigt werden, dass das im Vektor enthaltene Neomycin-Resistenzgen ebenfalls weiterhin transkribiert wurde und als mRNA mittels RT-PCR nachweisbar war (Abb. 4-3; C). Ferner war dies auch der Fall bei sämtlichen, mit dem Leervektor pCR3.1-Uni-Ø transfizierten Zellen unter Selektionsbedingungen.

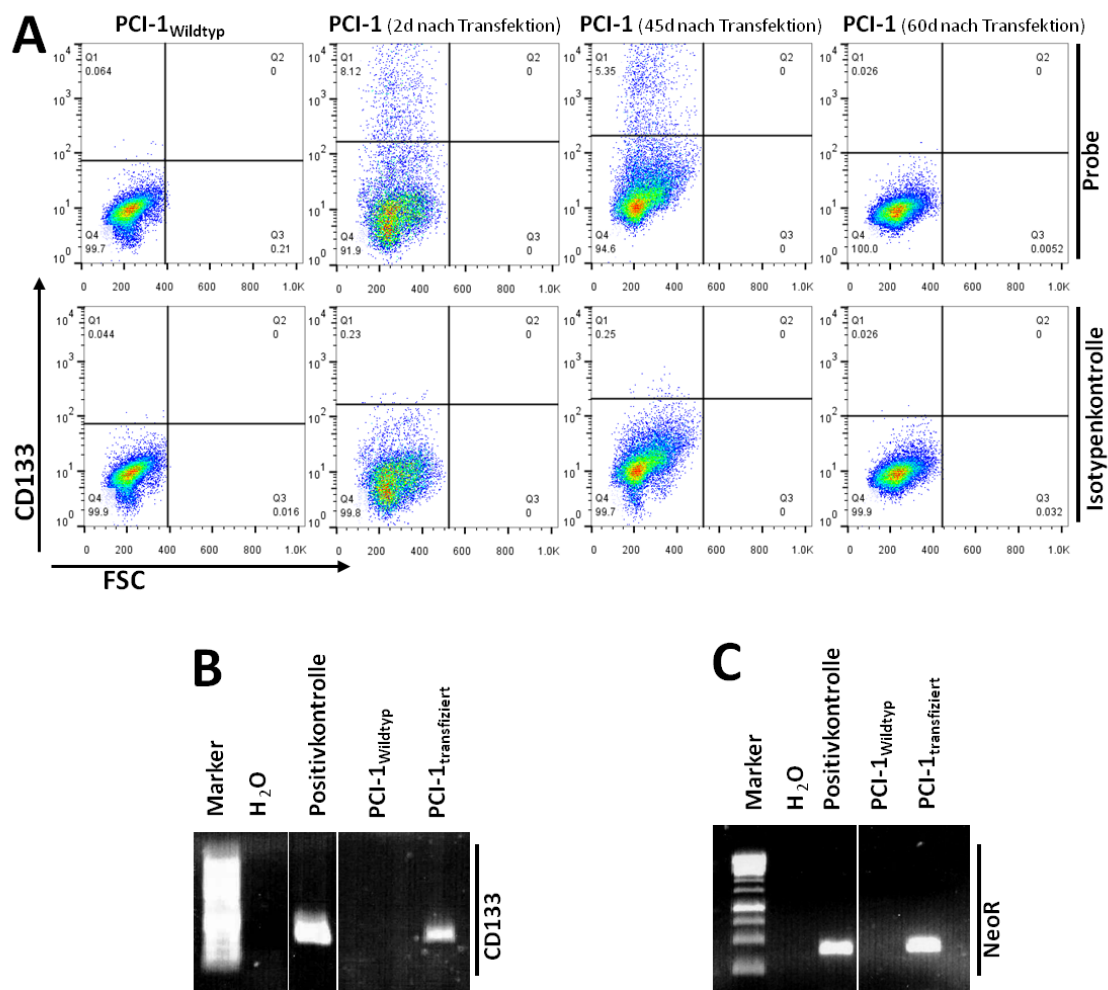


Abb. 4-3: Abnahme der CD133-Proteinexpression an der Zelloberfläche im Verlauf nach Transfektion und Nachweis der Plasmidexpression auf mRNA-Ebene.

(A) PCI-1-Zellen wurden mit pCR3.1-Uni-CD133 transfiziert und die CD133-Expression verglichen mit einer Isotypenkontrolle sowie Wildtypzellen im zeitlichen Verlauf unter Selektionsbedingungen durchflusszytometrisch evaluiert. Der prozentuale Anteil der Zellen pro Quadrant ist in jedem Diagramm angegeben. Als Primärantikörper kamen AC133 (Miltenyi) und IgG2a (Isotypenkontrolle) zur Anwendung. **(B)** Eine RT-PCR mit Agarose-Gelelektrophorese 60 Tage nach Transfektion mit pCR3.1-Uni-CD133 zeigt weiterhin Expression von CD133-mRNA in PCI-1-Zellen (unter Selektionsbedingungen) trotz fehlender Nachweisbarkeit von CD133-Proteinexpression. **(C)** Nachweis der Expression des Neomycin-Resistenzgens in PCI-1-Zellen unter Selektionsbedingungen 60 Tage nach Transfektion.

Eine erhöhte, mit einem AC133-Antikörper detektierbare Transfektionseffizienz konnte weder durch Veränderungen der Transfektionsbedingungen noch durch eine der Änderung der Neomycin-Konzentration des Selektionsmediums erreicht werden.

4.3 Etablierung stabiler CD133-Expression in HEK293-Zellen

Mittels Magnet-assistierter Transfektion wurde der Vektor pCR3.1-Uni-CD133 ebenso in die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293 eingebracht, in welcher das AC133-Epitop vor Transfektion proteinbiochemisch und auf mRNA-Ebene nicht zu detektieren war. Durchflusszytometrisch war jedoch im Vergleich zur Isotypenkontrolle eine leicht erhöhte MFI ($3,02 \pm 0,51$ im Vergleich zum Referenzwert 1) zu beobachten (siehe 4.1). In der logarithmischen Wachstumsphase unter Selektionsbedingungen zeigten diese Zellen nach Transfektion in der Durchflusszytometrie neben einer CD133⁻ Hauptpopulation, welche $90,7\% \pm 1,0\%$ der Zellen darstellte, eine weitere Zellpopulation mit erhöhter CD133-Expression (Abb. 4-4). Diese umfasste $9,3\% \pm 1,0\%$ der Zellen und zeigte im Vergleich zur Hauptpopulation eine um etwa das 15fache erhöhte MFI für CD133.

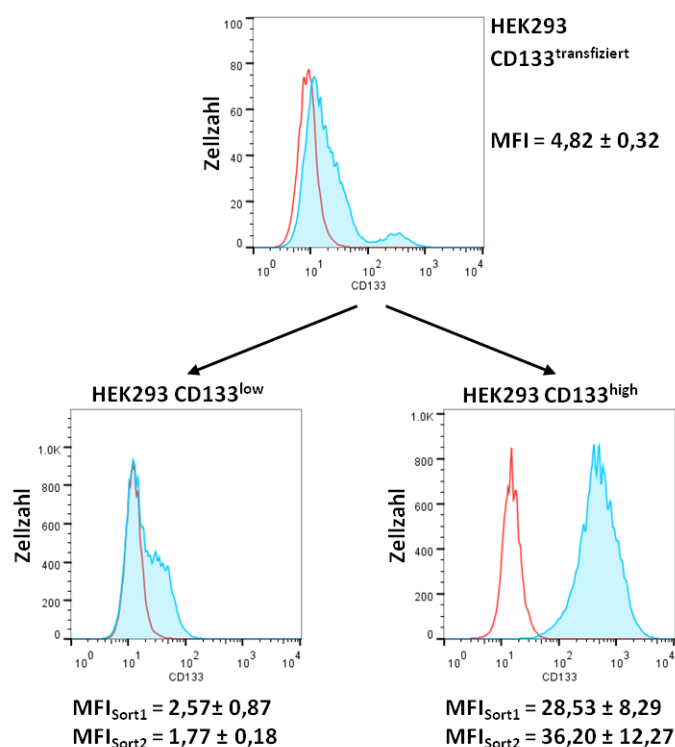


Abb. 4-4: CD133-Oberflächenexpression in transfizierten HEK293-Zellen vor und nach Zellsortierung.

Dargestellt ist die durchflusszytometrisch gemessene CD133-Expression stabiler Transfektion mit pCR3.1-Uni-CD133 unter Selektionsbedingungen (HEK293-CD133^{transfiziert}). Es wurde eine Sortierung dieser Zellen hinsichtlich CD133-Expression in HEK293-CD133^{high} und HEK293-CD133^{low} durch zweimalige Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung vorgenommen. Als Primärantikörper wurde AC133 (Miltenyi) verwendet sowie IgG2a (Isotypenkontrolle). Gezeigt ist das Ergebnis als Histogramm jeweils nach dem zweiten Sortierungsschritt (Isotypenkontrolle rot; CD133-Detektion blau). Zudem angegeben ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Zellpopulationen mit Standardabweichung für die Ausgangszellpopulation sowie HEK293-CD133^{high} und HEK293-CD133^{low} nach erster und zweiter Zellsortierung (Sort1/2).

Aus diesen CD133-transfizierten Zellen wurden anschließend durchflusszytometrisch die Populationen mit der höchsten respektive niedrigsten Expression von CD133 sortiert, isoliert und separat weiterkultiviert. Durch eine weitere Zellsortierung dieser zwei Populationen konnte letztlich

eine MFI von $36,20 \pm 12,27$ in HEK293-CD133^{high}-Zellen und von $1,77 \pm 0,18$ in HEK293-CD133^{low}-Zellen erreicht werden. Nach dem ersten Sortierungsschritt hatte die MFI bei $28,53 \pm 8,29$ und $2,57 \pm 0,87$ gelegen, wie in Abb. 4-4 dargestellt ist. Die mit dem zweiten Sortierungsschritt gewonnenen Populationen wurden im Anschluss für weitere Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* herangezogen und zeigten auf mRNA- und Proteinebene ein konstantes Niveau in Bezug auf die Expression von CD133.

4.4 Charakterisierung der CD133-Expression in HEK293-CD133^{high/low}-Zellen

Da, wie eingangs ausführlich beschrieben und im Fall der ersten Transfektionsexperimente beobachtet, oftmals eine Diskrepanz zwischen der Detektion von CD133-mRNA und insbesondere des AC133-Epitops von CD133 besteht, sollte im Weiteren eine genauere Charakterisierung bezüglich mRNA- und Proteinexpression in HEK293-CD133^{high/low}-Zellen erfolgen.

Zunächst wurde eine RT-PCR der HEK293-CD133^{high/low}-Zellen mit CD133-spezifischen Primern durchgeführt. Die Agarose-Gelelektrophorese ließ erkennen, dass die Zellsortierung anhand von membrangebundener CD133-Proteinexpression auch in unterschiedlichen mRNA-Expressionslevels von CD133 resultiert. Bei vergleichbar stark ausgeprägter Darstellung der GAPDH-Banden als Ladekontrolle ist die CD133-Bandenintensität der HEK293-CD133^{low}-Probe sichtbar vermindert im Vergleich zur HEK293-CD133^{high}-Probe (Abb. 4-5; A). Eine weitere RT-PCR zum Nachweis der mRNA-Expression des Neomycin-Resistenzgens zeigte, dass unter Selektionsbedingungen sowohl in HEK293-CD133^{high}-Zellen als auch in HEK293-CD133^{low}-Zellen das Resistenzgen transkribiert wurde (Abb. 4-5; B).

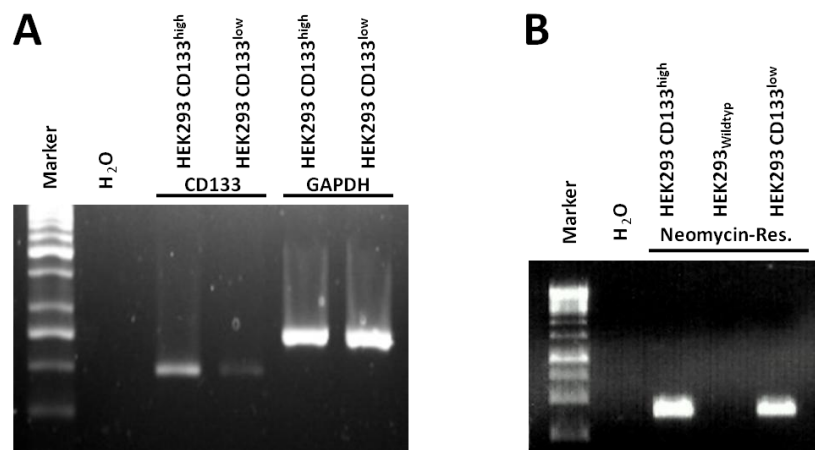


Abb. 4-5: mRNA-Expression (CD133, Neomycin-Resistenzgen) in HEK293 CD133^{high/low}-Zellen.

(A) Dargestellt ist das Ergebnis einer RT-PCR mit Agarose-Gelelektrophorese von HEK293-CD133^{high/low}-Zellen zum Nachweis differentieller CD133-mRNA-Expression. Als Ladekontrolle diente GAPDH. **(B)** Die mRNA-Expression des Neomycin-Resistenzgens in HEK293-CD133^{high/low}-Zellen wurde hier mittels RT-PCR nachgewiesen. HEK293-Wildtyp-Zellen zeigten keine Expression des Resistenzgens.

Um auszuschließen, dass Zellen, die keine nachweisbare CD133-Proteinexpression an der Zelloberfläche zeigen, intrazellulär detektierbares CD133 enthalten, wurden Western Blots von Zelllysaten der HEK293-CD133^{high/low}-Zellen angefertigt. Als Negativkontrolle dienten hierbei HEK293-Wildtyp-Zellen, als Positivkontrolle Caco-2-Zellen, welche eine hohe endogene CD133-Expression zeigen. Mit zwei unterschiedlichen Antikörpern C24B9 (Cell Signaling; CS) und W6B3C1 (Miltenyi; MY)

ließen sich weder in Zelllysaten von HEK293-Wildtyp noch HEK293-CD133^{low}-Zellen Banden im Bereich des CD133-Proteins nachweisen. HEK293-CD133^{high} hingegen demonstrierten eine starke CD133-Expression im zu erwartenden Bereich zwischen 95kD (Molekulargewicht des unmodifizierten Proteins) und 115-120kD, was dem Molekulargewicht des glykosylierten Proteins CD133 entspricht. Eine klar abgegrenzte Bande war hierbei im unteren Abschnitt zu erkennen und eine intensiver ausgeprägte CD133-Proteindetektion fand sich im Bereich oberhalb des Molekulargewichts von 115kD. Ähnliche Resultate ließen sich für endogen exprimiertes CD133 aus Caco-2-Zellen feststellen, wobei es hier innerhalb der gleichen Grenzen zu einer homogenen Verteilung der Proteindetektion kam, ohne dass mehrere einzelne Banden separierbar waren. Beide verwendeten Primärantikörper C24B9 und W6B3C1 lieferten vergleichbare Resultate (Abb. 4-6; A).

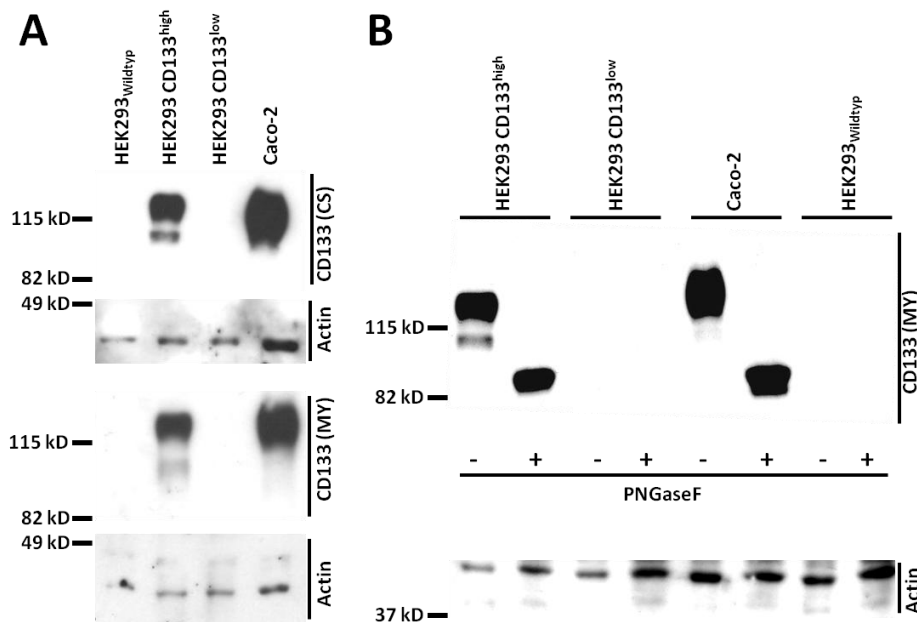


Abb. 4-6: Proteinbiochemische Detektion von CD133 in HEK293-CD133^{high/low}-Zellen.

(A) Gezeigt wird die CD133-Protein-Detektion mittels Western Blot und SDS-Gelelektrophorese in HEK293-CD133^{high/low}-Zellen sowie HEK293-Wildtyp-Zellen mit den Primärantikörpern W6B3C1 (Miltenyi) und C24B9 (Cell Signaling). Als Positivkontrolle dienen Caco-2-Zellen mit endogener CD133-Expression und als Ladekontrolle Actin. Detektion und Visualisierung erfolgten mittels HRP-konjugierter Sekundärantikörper und ECL. (B) Protein im Zelllysate wurde zunächst mit PNGase F deglykosyliert und anschließend in SDS-Gelelektrophorese und Western Blot analysiert. Hierbei wurde der Primärantikörper W6B3C1 (Miltenyi) mittels HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper gebunden. Die Detektion erfolgte mit ECL.

Nachdem bekannt ist, dass CD133 extrazellulär acht potentielle N-Glykosylierungsstellen besitzt und in CSCs zumeist in stark glykosylierter Form nachgewiesen wird, wurden in einer weiteren Untersuchung Gesamtzelllysate mit dem Enzym Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F) behandelt, welches eine Spaltung N-glykosidischer Bindungen bewirkt. Diese Deglykosylierung führte zu einer Veränderung der Laufeigenschaften des Proteins in der SDS-Gelelektrophorese und hatte zur Konsequenz, dass sich das apparente Molekulargewicht des Proteins verringerte und somit die Proteindetektion im Bereich des unglykosylierten CD133 bei etwa 95kD erfolgte. Dieser Effekt konnte in HEK293-CD133^{high} und Caco-2 gezeigt werden. Im Fall von HEK293-CD133^{low} und HEK293-Wildtyp war erwartungsgemäß weder vor noch nach Behandlung mit PNGase F durch den AC133-Antikörper (Miltenyi) Protein zu detektieren, wie aus Abb. 4-6 (B) ersichtlich ist.

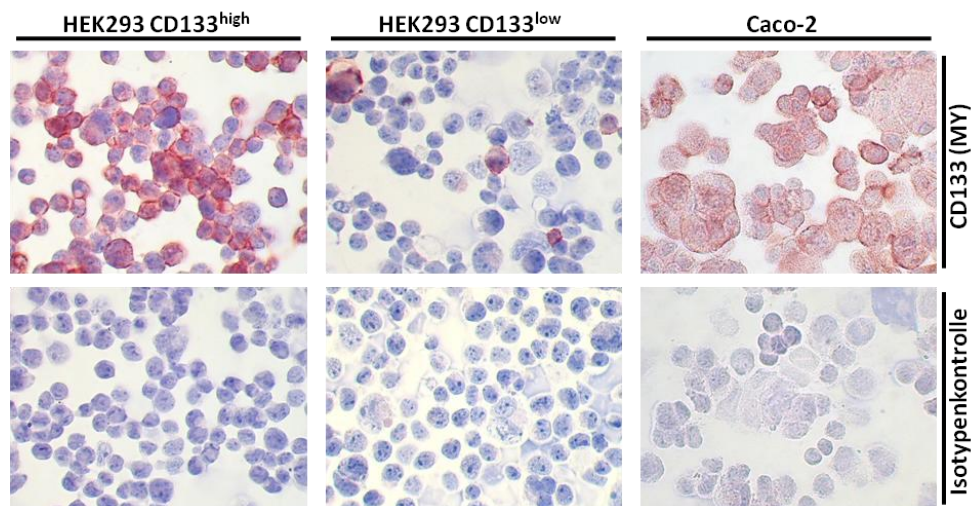


Abb. 4-7: Immunzytochemische Färbung von HEK293-CD133^{high/low}-Zellen und Caco-2-Zellen.

Hier ist die immunzytochemische Analyse von HEK293-CD133^{high/low}-Zellen und Caco-2-Zellen mit dem Primärantikörper AC133 (Miltenyi) dargestellt. Die Färbung erfolgte mittels biotinyliertem Sekundärantikörper, Avidin-Biotin-Peroxidase und Aminoethylcarbazol (AEC). Ferner ist die jeweilige Isotypenkontrolle (IgG1) gezeigt.

Im Weiteren wurden immunzytochemische Färbungen angefertigt, bei denen ebenfalls der Antikörper AC133 verwendet wurde. Die hierbei erzielten Ergebnisse bestätigten die zuvor beschriebenen Resultate im Hinblick auf die CD133-Oberflächenexpression der untersuchten Zellen. Während HEK293-CD133^{high}-Zellen ein sehr homogen intensives Färbemuster zeigten, was etwa dem der Caco-2-Zellen entsprach, konnten bei HEK293-CD133^{low}-Zellen nur vereinzelt stark CD133⁺ Zellen gefunden werden, während die übrigen Zellen keine Färbung aufwiesen (Abb. 4-7).

4.5 Proliferationsverhalten und Zellzyklusverteilung von HEK293-CD133^{high/low}-Zellen

Im Folgenden wurde untersucht, ob ektopisch exprimiertes CD133 einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten *in vitro* hat. Dabei wurde die Zellproliferation über eine Zeitspanne von vier Tagen nach Ausplattieren der Zellen beobachtet und täglich die Zellzahl bestimmt. Unter Wachstumsbedingungen in DMEM-Medium mit Supplementierung von 10% FCS zeigte die Zellproliferation von HEK293-CD133^{high}- und HEK293-CD133^{low}-Zellen keine signifikanten Unterschiede (Abb. 4-8; links). Die Reduktion des FCS-Anteils auf 3% und damit eine verminderte Wachstumsstimulation, verringerte die Proliferationsrate beider Zellpopulationen deutlich im Vergleich zum Wachstum bei 10% FCS, wie Abb. 4-8 (rechts) zu entnehmen ist. Auch hierbei konnte kein eindeutiger Proliferationsunterschied zwischen den Vergleichspopulationen festgestellt werden, es war jedoch der Trend erkennbar, dass HEK293-CD133^{low}-Zellen sowohl unter 10% als auch 3% FCS eine leicht erhöhte Proliferationsrate zeigten. Eine weitere Reduktion des FCS-Anteils auf 1% bewirkte in beiden Populationen spätestens am dritten Versuchstag einen ausgeprägten Verlust der Zelladhärenz, weshalb eine valide Beurteilung des Wachstumsverhaltens der Zellen unter diesen Bedingungen über vier Tage nicht erfolgen konnte.

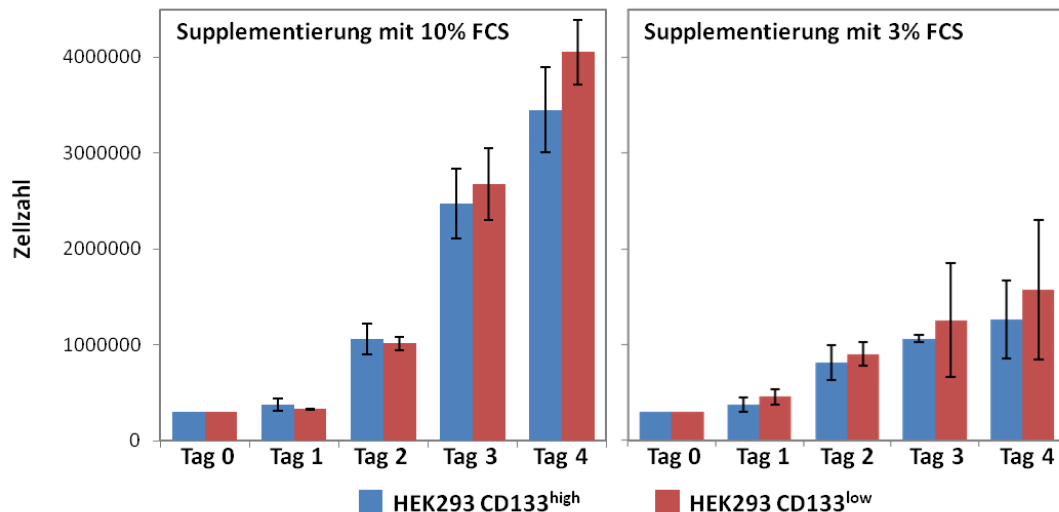


Abb. 4-8: Charakterisierung von HEK293-CD133^{high/low}-Zellen hinsichtlich des Wachstumsverhalten.

Vergleichende Darstellung des Wachstumsverhaltens von HEK293-CD133^{high/low}-Zellen über einen Zeitraum von vier Tagen nach Ausplattieren. Links ist das Säulendiagramm für das Wachstum unter Standard-Zellkulturbedingungen (10% FCS) und rechts unter FCS-Reduktion auf 3%. Zudem ist jeweils die Standardabweichung angegeben.

Die Untersuchung der Zellzyklusverteilung (Abb. 4-9) sollte genaueren Aufschluss darüber geben, ob sich die Zellpopulationen in ihrer Reaktion auf Änderungen der Wachstumsbedingungen substantiell unterscheiden. Hierzu wurden HEK293-CD133^{high/low}-Zellen nach dem Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase für 22 Stunden in Medium mit 10% oder 0,1% FCS inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen entweder unverzüglich mit Ethanol fixiert und weiter analysiert oder vor der Fixation nochmals mit 10% FCS für 30 Minuten respektive 10 Stunden inkubiert, um Aufschluss darüber zu bekommen, ob Zellen nach einer Phase mit verminderter Stimulation durch Wachstumssignale unterschiedlich auf die Readdition von FCS reagieren. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte anhand des Fluorochroms Nuclear-IDTM Green (Enzo Life Sciences), welches selektiv in doppelsträngige DNA interkaliert. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit Nocodazol (1µl/10ml Medium) inkubiert, das einen Arrest in der G₂/M-Phase durch Mikrotubuli-Depolymerisation hervorruft. Ferner beinhaltete die Negativkontrolle DMSO (1µl/10ml Medium), dem für Nocodazol verwendeten Lösungsmittel.

Die Auswertung der Messungen ergab, dass Nocodazol in beiden Zellpopulationen vergleichbar stark zu einem Arrest der Zellen in der G₂/M-Phase (83% ± 8% in CD133^{high} und 89% ± 9% in CD133^{low}) führte. Darüber hinaus waren keine Unterschiede in der Zellzyklusverteilung zwischen Kultivierung unter Standardbedingungen mit 10% FCS und Reduktion des FCS-Anteils auf 0,1% zu erkennen. Es befanden sich, unabhängig vom Grad der FCS-Supplementierung, jeweils etwa 15% der Zellen in der S-Phase, 30% in der G₂/M-Phase und 55% in der G₁/G₀-Phase. Es war somit keine Reduktion des Anteils von Zellen, die sich in der S-Phase befanden, zu beobachten. HEK293-CD133^{high}- und HEK293-CD133^{low}-Zellen unterschieden sich ebenso wenig in ihrer Reaktion auf FCS-Readdition. In der Analyse 10 Stunden nach Zugabe von 10% FCS ließ sich jedoch der Trend erkennen, dass in der HEK293-CD133^{low}-Population ein im Vergleich zu den HEK293-CD133^{high}-Zellen erhöhter Prozentsatz der Zellen in der S-Phase war (19,5% ± 3,1% versus 12,8% ± 1,5%). Dagegen befanden sich weniger HEK293-CD133^{low}-Zellen in der G₁/G₀-Phase (46,1% ± 3,4% versus 53,6% ± 2,0%). Der Anteil an Zellen in der G₂/M-Phase war hingegen nahezu identisch (34,4% ± 4,3% und 33,6% ± 3,1%) (Abb. 4-9).

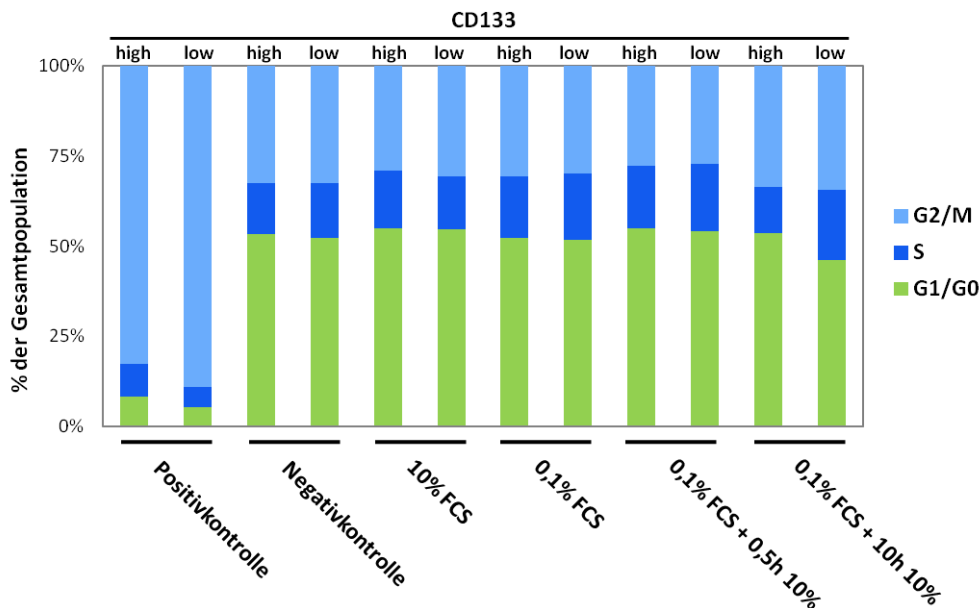


Abb. 4-9: Analyse der Zellzyklusverteilung von HEK293-CD133^{high/low}-Zellen.

Die Zellzyklusverteilung von HEK293-CD133^{high/low}-Zellen wurde unter verschiedenen Wachstumsbedingungen (10% FCS; 0,1% FCS für 22h; 0,1% FCS für 22h und Readdition von 10% FCS für 0,5h oder 10h) bestimmt. G₂/M-Arrest durch Nocodazol diente als Positivkontrolle, DMSO-Zugabe als Negativkontrolle. Gezeigt ist das Ergebnis der Auswertung von drei unabhängigen Versuchen.

Weitere Untersuchungen *in vitro* zielten darauf ab, die Migrationsfähigkeit und Chemotaxis der HEK293-CD133^{high/low}-Zellen zu beurteilen. Es wurden hierfür Boyden-Kammern mit einer für Zellen permeablen Membran verwendet (Porengröße 8,0µm). Diese Kammern wurden in 6-Lochplatten eingesetzt, wobei sich auf der Unterseite der Membran Zellkulturmedium mit 10% FCS-Zusatz befand, auf der Oberseite Hungermedium (serumfrei). Die einzige Verbindung zwischen beiden Bereichen bestand über die Poren der Membran. Zur Beurteilung der Migrationsfähigkeit und Chemotaxis der HEK293-CD133^{high/low}-Zellen entlang eines FCS-Gradienten wurden zum Hungermedium Zellen gegeben, die zudem über Nacht in Medium mit reduziertem FCS-Gehalt von 0,1% kultiviert worden waren. Nach 5 oder 24 Stunden Inkubation wurde die Migrationsfähigkeit der Zellen durch die Membran beurteilt. Hierzu erfolgte eine Fixierung der migrierten Zellen mit Methanol und eine Färbung mit Trypanblau. Bei der mikroskopischen Auswertung der Membran konnte jedoch weder bei HEK293-CD133^{high}- noch bei HEK293-CD133^{low}-Zellen Migration durch die Membran festgestellt werden. Eine weitere, einfache Beurteilung der Migrationsfähigkeit aus dem Zellverband *in vitro*, der *scratch assay*, lieferte vergleichbare Ergebnisse. Chemotaxis anhand eines chemischen Gradienten kann hierdurch jedoch nicht beurteilt werden. Zellen wurden bis zur Konfluenz inkubiert und anschließend wurde mit einer Pipettenspitze ein artifizierter Riss durch die Zellschicht gezogen. Anschließend wurde das Potential der Zellen, in diese Lücke zu migrieren, beurteilt. Keine der beiden untersuchten Populationen zeigte Migrationstendenzen über einen Zeitraum von zwei Tagen.

4.6 Evaluation des Tumorinitiierungsverhaltens von HEK293-CD133^{high/low}-Zellen *in vivo*

CD133⁺ Zellen stellen in vielen Tumorentitäten eine der Tumor-initiiierenden CSC-Populationen dar, wie anhand von Xenotransplantationsmodellen demonstriert wurde, bei denen das tumorigene Potential humaner Krebszellen durch orthotope oder heterotope Injektion in immuninkompetente Mäuse beobachtet wurde (siehe 2.6.9).

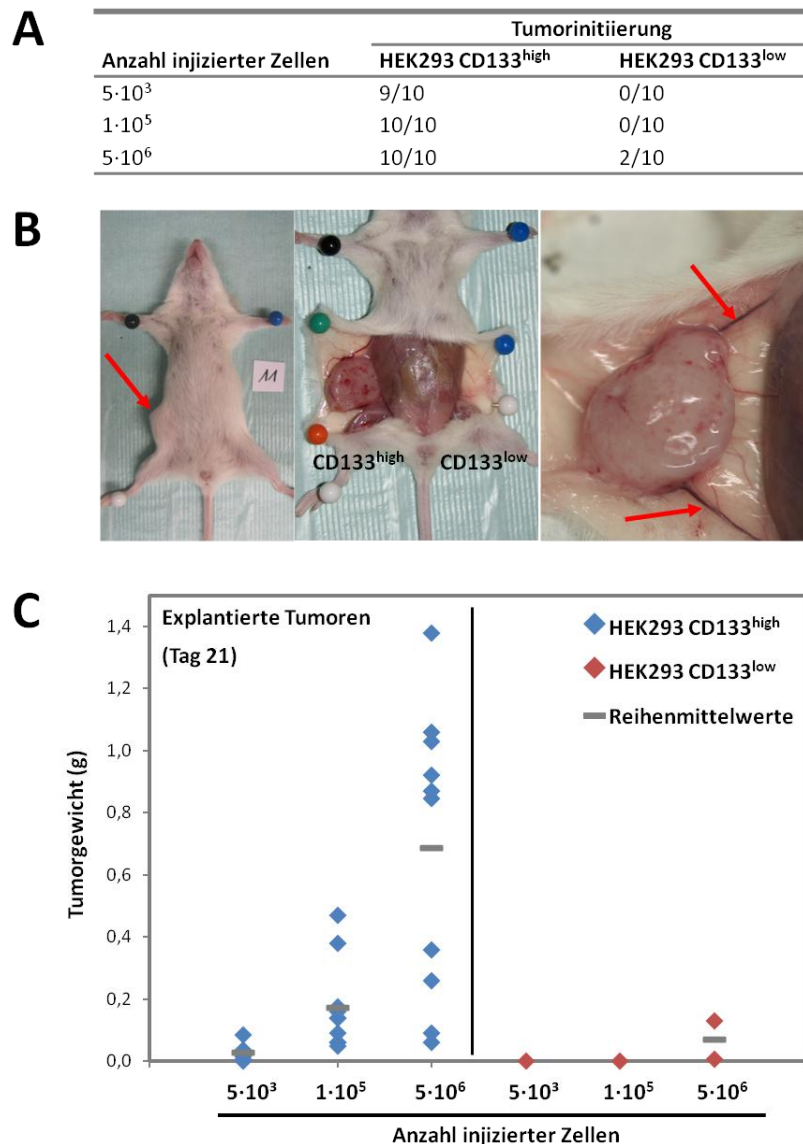


Abb. 4-10: Tumorinitiierung *in vivo* durch HEK293-CD133^{high/low}-Zellen.

(A) Übersichtstabelle zur Häufigkeit von Tumorinitiierung in Abhängigkeit von der Anzahl injizierter Zellen. Kumulativ generierten HEK293-CD133^{high}-Zellen 29 Tumoren bei 30 Injektionen, HEK293-CD133^{low}-Zellen hingegen nur 2, welche durch Injektion der höchsten Zellzahl zustande kamen. **(B)** Exemplarische Darstellung der Tumorformation in NOD/SCID-Mäusen. Nach 21 Tagen sind teils deutlich tast- und sichtbare Tumoren (Pfeil) nach subkutaner Injektion von HEK293-CD133^{high/low}-Zellen in verschiedenen Zellzahlen in die rechte und linke Flanke der Tiere zu erkennen (links). In der Mitte findet sich die Abbildung eines großen Tumors, hervorgegangen aus $5 \cdot 10^6$ HEK293-CD133^{high}-Zellen, wohingegen auf der gegenüberliegenden Seite keine Tumorinduktion durch die gleiche Anzahl injizierter HEK293-CD133^{low}-Zellen zu erkennen ist. Rechts vergrößert dargestellt ist ein HEK293-CD133^{high}-Tumor mit deutlich sichtbarer, ausgeprägter Gefäßversorgung (Pfeile). **(C)** Im Diagramm ist das Gewicht der nach 21 Tagen entnommenen Tumoren gezeigt, aufgeschlüsselt nach Anzahl injizierter Zellen und getrennt in HEK293-CD133^{high}- (links) sowie HEK293-CD133^{low}-Tumoren (rechts). Zusätzlich ist das mittlere Gewicht der einzelnen Reihen angegeben, das bei HEK293-CD133^{high}-Tumoren mit der Anzahl injizierter Zellen ansteigt.

Bis *dato* sind jedoch keine Daten bekannt, welchen Einfluss das Protein CD133 selbst auf Tumorinitiierung hat oder wie sich ektopisch exprimiertes CD133 auf das Tumorinduktionsverhalten primär nicht-tumorigener Zellen auswirkt. Um dieser Frage nachzugehen, wurden HEK293-CD133^{high/low}-Zellen mit drei verschiedenen Zellzahlen subkutan in die rechte respektive linke Flanke von immuninkompetente NOD/SCID-Mäusen injiziert. Die Beobachtungsdauer betrug hierbei 21 und

36 Tage. Nach etwa 14 Tagen waren bei der höchsten Zellzahl ($5 \cdot 10^6$ Zellen) im Bereich der Injektionsstelle der HEK293-CD133^{high}-Zellen Tumoren tastbar. An Tag 21 nach Injektion wurden die Tiere getötet und die Tumoren entnommen. Insgesamt konnte in 2 unabhängigen Experimenten in 29 von 30 Fällen eine Tumorinduktion durch HEK293-CD133^{high}-Zellen beobachtet werden (97%), hingegen nur in 2 von 30 Fällen der HEK293-CD133^{low}-Zellen (7%), wobei diese zwei Tumoren nur durch Injektion der höchsten Zellzahl ($5 \cdot 10^6$ Zellen) zustande kamen. HEK293-CD133^{high}-Zellen bildeten auch bei Injektion von $1 \cdot 10^5$ Zellen in 10 von 10 Fällen Tumoren, die gleiche Anzahl injizierter HEK293-CD133^{low}-Zellen führte in keinem Fall zu sichtbarer Tumorformation. Ebenso wenig erzeugten $5 \cdot 10^3$ Zellen Tumoren. HEK293-CD133^{high}-Zellen konnten auch bei dieser geringen Zellzahl noch in 9 von 10 Fällen Tumoren induzieren. Diese Ergebnisse finden sich zusammengefasst in Abb. 4-10 (A). Insgesamt entspricht dies einer um mindestens das 1000fache gesteigerten Frequenz Tumor-induzierender Zellen innerhalb der HEK293-CD133^{high}-Population im Vergleich zu den HEK293-CD133^{low}-Zellen in NOD/SCID-Mäusen.

Makroskopisch ließ sich beobachten, dass insbesondere die entnommenen HEK293-CD133^{high}-Tumoren eine ausgeprägte Versorgung mit Blutgefäßen zeigten, wie exemplarisch für einen HEK293-CD133^{high}-Tumor der höchsten Zellzahl in Abb. 4-10 (B; rechtes Bild) dargestellt ist.

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Unterschiede in der Tumorformation darauf beruhen, dass HEK293-CD133^{low}-Zellen eine geringere Proliferationsrate *in vivo* aufweisen oder nach erfolgreichem *engraftment* erst zu einem späteren Zeitpunkt Tumoren ausbilden, wurde das Tumorinduktionsverhalten an fünf Mäusen, die mit jeweils $5 \cdot 10^3$ Zellen injiziert wurden, über einen Zeitraum von 36 Tagen beobachtet. Hierbei ließen sich in allen Fällen HEK293-CD133^{high}-Tumoren mit einem Gewicht zwischen 0,12g und 1,22g entnehmen, in keinem der Fälle jedoch bildeten HEK293-CD133^{low}-Zellen Tumoren.

Hinsichtlich des Tumorgewichts der nach 21 Tagen entnommenen Tumoren zeigte sich eine große Variabilität. Das Gewicht der entnommenen HEK293-CD133^{high}-Tumoren bei Injektion von $5 \cdot 10^3$ Zellen lag zwischen 5mg und 85mg, bei Injektion von $1 \cdot 10^5$ Zellen zwischen 50mg und 470mg (Abb. 4-10; C). Nach Injektion von $5 \cdot 10^6$ Zellen erreichten die Tumoren mindestens ein Gewicht von 60mg, im maximalen Fall betrug das Tumorgewicht mit 1,4g etwa 7% des Körpergewichts der betreffenden Maus. Das mittlere Tumorgewicht stieg in Abhängigkeit von der Anzahl injizierter Zellen bei HEK293-CD133^{high}-Tumoren an. Das mittlere Gewicht der zwei bei höchster Zellzahl entnommenen HEK293-CD133^{low}-Tumoren lag mit 0,07g etwa im Bereich des Gewichts der HEK293-CD133^{high}-Tumoren niedrigster Zellzahl (0,03g) und nur bei 10% des mittleren Gewichts von HEK293-CD133^{high}-Tumoren der höchsten Zellzahl. Diese Ergebnisse finden sich grafisch dargestellt in Abb. 4-10 (C).

4.7 Mikroskopische Beurteilung entnommener HEK293-CD133^{high/low}-Tumoren

Eine weitere Analyse der Tumoren erfolgte im Anschluss an die Entnahme mittels verschiedener histologischer und immunhistochemischer Färbungen. Morphologisch zeigte sich bei HEK293-CD133^{high}-Tumoren in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung ein homogenes Zellbild mit vereinzelt Gefäßanschnitten. Wie in Abb. 4-11 (A) dargestellt ist, ergab die immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper AC133 (Miltenyi) ein intensives Färbemuster in allen Tumorbereichen der HEK293-CD133^{high}-Tumoren. Im Gegensatz dazu waren bei den zwei HEK293-CD133^{low}-Tumoren nur vereinzelt positive Zellen zu erkennen, was der Verteilung der CD133-Expression in den jeweiligen Zellkulturen entsprach. In beiden Fällen war keinerlei Färbung der Isotypenkontrolle zu erkennen. Die Analyse mit einem Antikörper gegen das Protein Ki67 zeigte sowohl in HEK293-CD133^{high}- als auch in HEK293-

CD133^{low}-Tumoren eine starke nukleäre Färbung, was ein Indikator für proliferative Tätigkeit dieser Zellen ist (Abb. 4-11; A).

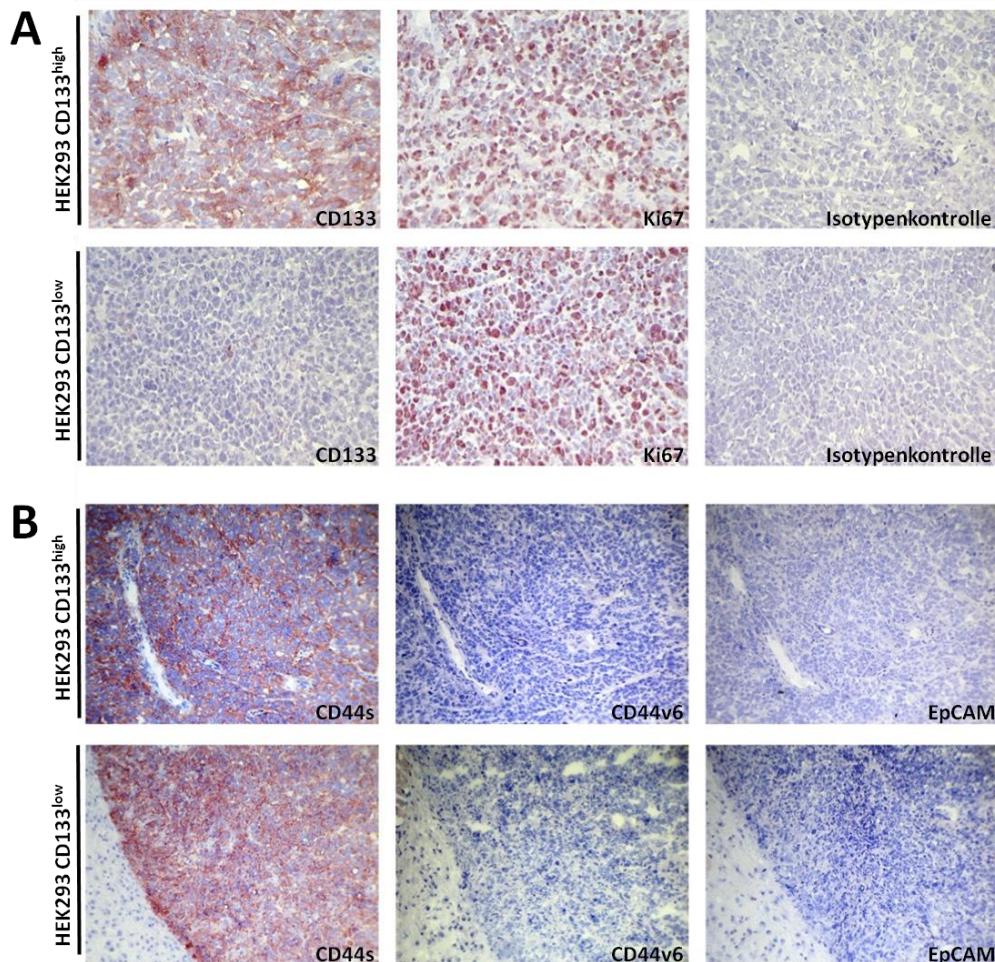


Abb. 4-11: Immunhistochemische Färbung von HEK293-CD133^{hoch/low}-Tumoren aus NOD/SCID-Mäusen.

(A) Darstellung der differentiellen Detektion des AC133-Epitops in Kryoschnitten von HEK293-CD133^{hoch/low}-Tumoren. Im Weiteren sind neben einer Färbung mit dem Proliferationsmarker Ki67 passende Isotypenkontrollen abgebildet. (B) Immunhistochemische Färbungen mit verschiedenen CSC-assoziierten Markern, welche in HEK293-CD133^{hoch/low}-Tumoren jeweils vergleichbare Positivität für CD44s zeigen und keine Färbung für CD44v6 und EpCAM. Spezifische Antikörper gegen CD133 (AC133), Ki67, CD44s, CD44v6 und EpCAM sowie eine IgG1-Isotypenkontrolle kamen zur Anwendung mit biotinylierten Sekundärantikörpern sowie Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex und Aminoethylcarbazol (AEC). Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse von Tumoren der höchsten Zellzahl ($5 \cdot 10^6$ injizierte Zellen; explantiert nach 21 Tagen).

Zusätzlich wurden Färbungen mit Antikörpern gegen weitere Transmembranproteine, die mit einer Steigerung des Tumorinitiierungspotentials in Verbindung gebracht werden, angefertigt. Hierzu zählen beispielsweise CD44 oder EpCAM. Tumoren aus HEK293-CD133^{hoch/low}-Zellen zeigten ein vergleichbar starkes Färbemuster für CD44s, die Standard-Splicevariante von CD44. Die Färbung für CD44v6, einer häufig Tumor-assoziierten CD44-Splicevariante, sowie für EpCAM zeigte in keinem der Tumoren erkennbare Positivität (Abb. 4-11; B).

4.8 Analyse des Transkriptoms von HEK293-CD133^{hoch/low}-Zellen

In Bezug auf Wachstumsverhalten, Zellzyklusverteilung oder etwa Migration *in vitro* konnte in den durchgeführten Versuchsreihen in HEK293-Zellen zwar kein eindeutiger Einfluss von ektopisch

exprimiertem CD133 gefunden werden. Dennoch kann es die Tumorigenitätsrate *in vivo* in nicht-tumorigenen Zellen erheblich steigern, was in Übereinstimmung mit der Beobachtung steht, dass innerhalb der CD133⁺ Subpopulation bestimmter Tumoren ein erhöhtes tumorigenes Potential vorliegt. Ein möglicher molekularbiologischer Hintergrund für diese Unterschiede in HEK293-CD133^{high/low}-Zellen sollte im Folgenden genauer untersucht werden. Hierzu wurde eine Genexpressionsanalyse (Agilent Sure Print G3 Human Gene Expression Microarray; Format 8x60K) von HEK293-CD133^{high/low}-Zellen durchgeführt, die bei IMGM Laboratories (Martinsried) in Auftrag gegeben wurde.

4.8.1 Quantifizierung und Qualitätskontrolle der Ausgangs-RNA

Vor Beginn der Array-Hybridisierung wurde die aus HEK293-CD133^{high/low}-Zellen isolierte RNA hinsichtlich zentraler Parameter analysiert. Zunächst erfolgten die Bestimmung der RNA-Konzentration der sechs Ausgangsproben sowie deren Reinheit in einem Spektralphotometer. Alle Proben zeichneten sich hierbei durch zufriedenstellende RNA-Konzentration (zwischen 493ng/μl und 1937ng/μl) und Reinheit aus, wobei als Maß für die Reinheit das Verhältnis der Absorption zwischen 260nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) und 280nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) herangezogen wurde. Bei A260/280-Verhältnissen von etwa 2,0 kann von hinreichender Reinheit ausgegangen werden. Sämtliche Ergebnisse lagen zwischen Werten von 2,07 und 2,10. Darüber hinaus wurde die Integrität der RNA mittels eines 2100 Bioanalyzers (Agilent Technologies) überprüft. Hierbei werden RNA-Proben durch Kapillar-Elektrophorese nach Fragmentgröße aufgetrennt. Das Verhältnis von 28S-rRNA zu 18S-rRNA, welches ein zentraler Indikator für RNA-Integrität ist, wenn es im Bereich von 2 liegt, erreichte in allen Proben Werte zwischen 1,8 und 2,0. Eine genauere Beurteilung der RNA-Integrität lässt der Algorithmus RIN (*RNA integrity number*) zu, in dessen Berechnung neben dem 28S/18S-rRNA-Verhältnis weitere Parameter des gesamten elektrophoretischen Profils einfließen. RIN-Werte liegen zwischen 1 (starke RNA-Degradierung) und 10 (optimale RNA-Qualität), wobei die Analyse sämtlicher verwendeter Proben Werte zwischen 9,7 und 10,0 ergab.

4.8.2 Microarray-Hybridisierung, Datenanalyse und Identifikation differentiell exprimierter Gene

Im folgenden Schritt wurden die RNA-Proben in cDNA transkribiert, welche in Cyanin-3-markierte cRNA überführt wurde. Mit der hierdurch gewonnenen cRNA erfolgte nach einer erneuten elektrophoretischen Kontrolle und Fragmentierung der cRNA-Proben die Hybridisierung auf Whole Human Genome Oligo Microarrays.

Um eine bessere Vergleichbarkeit der Daten herstellen zu können, erfolgte eine Quantil-Normalisierung, welche eine Angleichung der statistischen Eigenschaften verschiedener Datensätze ermöglicht. Der Pearson-Korrelationskoeffizient innerhalb der HEK293-CD133^{high}-Proben ergab Werte zwischen $r=0,984$ und $r=0,994$. Hohe Korrelationswerte zeigten auch die Ergebnisse der HEK293-CD133^{low}-Proben ($r=0,987-0,989$) sowie die Korrelationsanalyse der HEK293-CD133^{high}- mit der HEK293-CD133^{low}-Gruppe ($r=0,976-0,990$).

Die weitere statistische Analyse zeigte signifikant unterschiedlich regulierte Gene zwischen den Proben der HEK293-CD133^{high}- und HEK293-CD133^{low}-Zellen auf. Als Mindestwert für Regulation wurde eine Veränderung (*fold change*; FC) $\geq 2,0$ mit einem korrigierten p-Wert $\leq 0,05$ festgelegt. Verstärkte Genexpression in der HEK293-CD133^{high}- im Vergleich zur HEK293-CD133^{low}-Population konnte für 57 verschiedene Gene festgestellt werden. Als signifikant herunterreguliert mit FC $\geq 2,0$

(korrigierter p-Wert $\leq 0,05$) wurden 61 Gene erkannt. Insbesondere für CD133 konnte ein ausgeprägter Unterschied zwischen HEK293-CD133^{high/low}-Zellen festgestellt werden, der sich in einem FC von 171 bei einem korrigierten p-Wert von $1,6 \cdot 10^{-5}$ widerspiegelt. Der auf Proteinebene durchflusszytometrisch bestimmte Unterschied der MFI für CD133 belief sich in der HEK293-CD133^{high}-Population nur auf etwa das 23fache der HEK293-CD133^{low}-Population.

Eine zusätzliche Analyse hinsichtlich differentiell regulierter Signalwege, biologischer Prozesse und molekularer Funktionen erfolgte mit der PANTHER-Software. Hierbei flossen die Ergebnisse regulierter Gene ein, die einen FC $\geq 2,0$ bei einem p-Wert $\leq 0,01$ aufwiesen. Über den Vergleich konnten mehrere biologische Prozesse gefunden werden, die in HEK293-CD133^{high}-Zellen signifikant überrepräsentiert waren. Hierunter fielen insbesondere „Nukleosid-, Nukleotid- und Nukleinsäuremetabolismus“ (p-Wert $2,1 \cdot 10^{-6}$) mit den Subklassen „mRNA-Transkriptionsregulation“ (p-Wert $2,0 \cdot 10^{-12}$) und „mRNA-Transkription“ (p-Wert $9,0 \cdot 10^{-10}$). Ebenfalls signifikant erhöht waren „Zellproliferation und Differenzierung“ (p-Wert $2,8 \cdot 10^{-7}$).

In der Gruppe der molekularen Funktionen konnten ebenfalls regulierte Bereiche ausgemacht werden. Hier sind vor allem Transkriptionsfaktoren in HEK293-CD133^{high}-Zellen erhöht (p-Wert $7,0 \cdot 10^{-15}$), welche die Subklassen „KRAB Box Transkriptionsfaktoren“ und „Zink Finger Transkriptionsfaktoren“ beinhalten. Es konnten jedoch keine signifikant regulierten Signaltransduktionswege gefunden werden.

Insbesondere aus den vermehrt regulierten Genen dieser Kategorien wurde im Anschluss eine Auswahl verschiedener Gene zur genaueren Überprüfung der Regulation getroffen. Diese Gene finden sich in Tab. 4-1 aufgelistet.

Tab. 4-1: Auswahl potentieller CD133-Zielgene.

Der Fokus wurde insbesondere auf in HEK293-CD133^{high}-Zellen stark regulierte Teilbereiche (Zellproliferation und Differenzierung, mRNA-Transkription und deren Regulation) gelegt. Zur Auswahl kamen Gene mit einer Regulation von FC (*fold change*) $\geq 2,0$. Die Gene sind nach Heraufregulation und Herunterregulation (in HEK293-CD133^{high}-Zellen im Vergleich zu HEK293-CD133^{low}-Zellen) getrennt aufgelistet.

Gensymbol	Name	FC	Korrigierter p-Wert	GeneID	Lokalisation
Heraufregulation					
BACE2	beta-site APP-cleaving enzyme 2	47,15	0,0339	25825	21q22.3
CELF2	CUGBP, Elav-like family member 2	116,34	0,0499	10659	10p14
CNN2	calponin 2	4,89	0,0419	1265	19p13.3
DUSP5	dual specificity phosphatase 5	3,26	0,0003	1847	10q25.2
FERMT1	fermitin family homolog 1 (Drosophila)	4,29	0,0473	55612	20p12.3
GATA2	GATA binding protein 2	2,24	0,0817	2624	3q21.3
RBP7	retinol binding protein 7, cellular	44,15	0,0226	116362	1p36.22
SYK	spleen tyrosine kinase	2,71	0,0218	6850	9q22.2
ZNF420	zinc finger protein 420	2,00	0,1869	147923	19q13.12
ZNF91	zinc finger protein 91	2,34	0,0560	7644	19p12
Herunterregulation					
BAI3	brain-specific angiogenesis inhibitor 3	2,07	0,0473	577	6q13
DECR1	2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial	44,36	0,0021	1666	8q21.3
KLF11	Kruppel-like factor 11	2,08	0,0486	8462	2p25.1
RUNX3	runt-related transcription factor 3	8,73	0,0285	864	1p36.11

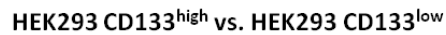
Darüber hinaus wurden mehrere Signalwege oder einzelne Proteine, die in der Literatur mit CD133 oder CD133⁺ Zellen in Zusammenhang gebracht wurden, analysiert. Hierzu zählen beispielsweise Src- und Fyn-Kinase (Boivin, Labbe et al. 2009; Chen, Wu et al. 2011), die direkt mit CD133 interagieren, verschiedene Transkriptionsregulatoren, die möglicherweise in der Transkription von CD133 eine Rolle spielen (Sp1, Myc) (Gopisetty, Xu et al. 2012) oder Proteine, die an der Glykosylierung von CD133 beteiligt sein könnten (MGAT3, ALG5, ALG8, ALG10) (Mak, Blakely et al. 2011). Die Daten der durchgeführten Genexpressionsanalyse zeigten jedoch für keines der genannten Gene eine signifikant verstärkte Regulation ($FC \geq 2,0$; korrigierter p-Wert $\leq 0,05$) in HEK293-CD133^{high/low}-Zellen.

4.8.3 Validierung der Microarray-Ergebnisse ausgewählter Gene

Die einzelnen, in HEK293-CD133^{high/low}-Zellen differentiell regulierten Gene, welche im Folgenden mittels RT-PCR nochmals hinsichtlich des Expressionsunterschieds überprüft werden sollten, wiesen einen FC zwischen 2,0 und maximal 116,3 auf (vgl. Tab. 4-1) und sind vor allem an Prozessen der Proliferation, Differenzierung oder mRNA-Transkriptionsregulation beteiligt.

Zunächst wurden in einem ersten Schritt passende Primerpaare gesucht, welche sämtliche bekannten mRNA-Isoformen der jeweiligen Gene detektieren und anschließend erfolgte die Bestimmung der optimalen Bedingungen für die PCR. Aus HEK293-CD133^{high/low}-Zellen wurde RNA isoliert und in cDNA transkribiert, um mittels RT-PCR die Ergebnisse des Microarrays überprüfen zu können.

Abb. 4-12 zeigt das Ergebnis dieser Überprüfung. Es wurden drei unabhängige Versuchsansätze mit übereinstimmenden Ergebnissen durchgeführt und exemplarisch ist das Ergebnis einer RT-PCR mit Agarose-Gelelektrophorese dargestellt. Das Microarray-Ergebnis einer Heraufregulation in HEK293-CD133^{high}-Zellen konnte für folgende Gene bestätigt werden: *beta-site APP-cleaving enzyme 2* (BACE2), *CUGBP*, *Elav-like family member 2* (CEL2), *calponin 2* (CNN2), *dual specificity phosphatase 5* (DUSP5), *fermitin family member 1* (FERMT1), *GATA binding protein 2* (GATA2), *retinol binding protein 7* (RBP7) und *spleen tyrosine kinase* (SYK). Die Gelelektrophorese ergab bei *zinc finger protein 91* (ZNF91) auch bei optimierter *Annealing*-Temperatur eine zweite, schwächere Bande unterhalb der erwarteten Hauptbande mit der Produktlänge von 736bp. Da die Familie der Zinkfingerproteine sehr viele Proteine mit einer hohen Sequenzhomologie umfasst, konnte kein passendes alternatives Primerpaar, welches spezifisch für ZNF91 ist, gefunden werden. Mit dem hier verwendeten Primerpaar konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden, ob der im Microarray festgestellte Regulationsunterschied (FC von 2,34) mittels RT-PCR bestätigt werden kann. Auch für ein weiteres Zinkfingerprotein, *zinc finger protein 420* (ZNF420), welches im Microarray signifikant heraufreguliert war (FC von 2,00), konnte in der weniger sensitiven RT-PCR kein eindeutiger Regulationsunterschied gezeigt werden.



RT-PCR-Ergebnisse nach erneuter mRNA-Isolierung aus HEK293-CD133^{high/low}-Zellen, getrennt nach herunter- und heraufregulierten Genen. Zudem dargestellt ist das Ergebnis für die Ladekontrolle GAPDH und für CD133. Die Abbildung zeigt das Ergebnis der RT-PCR und Agarose-Gelelektrophorese eines Experiments. Durchgeführt wurden drei unabhängige Experimente zur Bestätigung der Microarray-Ergebnisse mit übereinstimmenden Resultaten.

4.8.4 Vergleich der Microarray-Ergebnisse von HEK293-CD133^{high/low}-Zellen mit CD133-transfizierten HeLa-Zellen

54

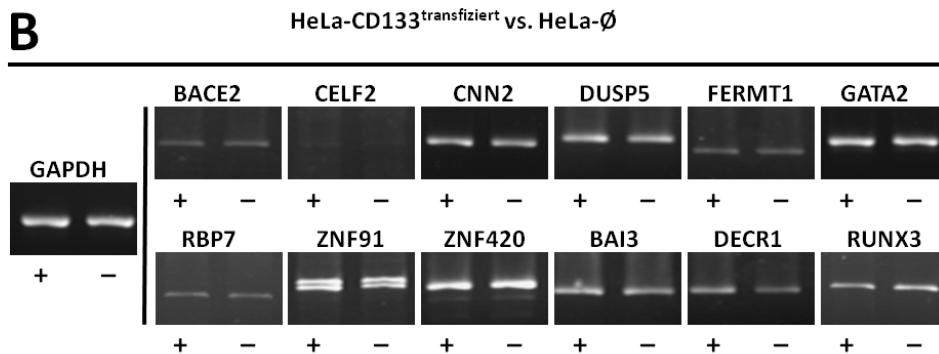
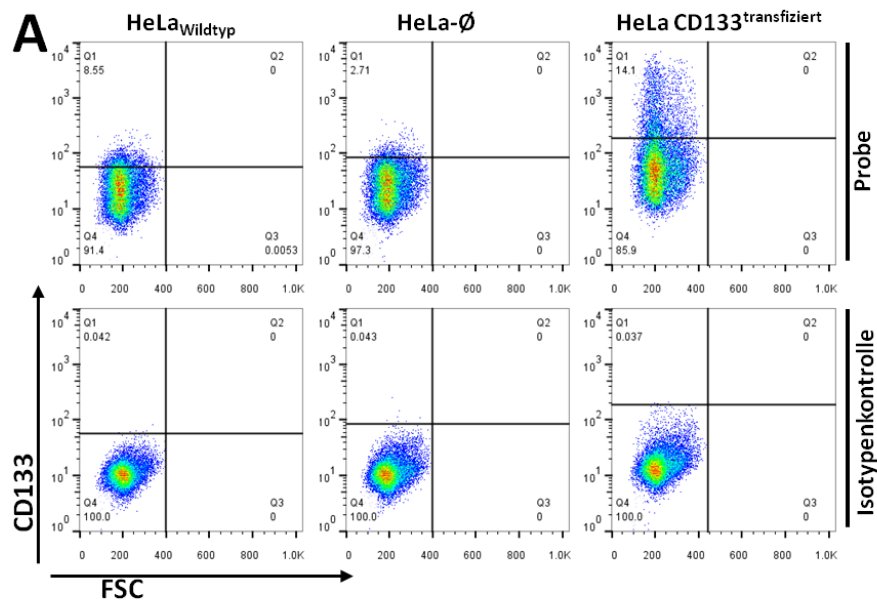


Abb. 4-13: Überprüfung der Microarray-Ergebnisse an transient CD133-transfizierten HeLa-Zellen.

(A) HeLa-Zellen wurden mit dem Vektor pCR3.1-Uni-CD133 sowie einem Leervektor (pCR3.1-Uni-Ø) transfiziert. Im Anschluss erfolgte die Isolation von RNA für die weitere Analyse. Die Transfektionseffizienz wurde durchflusszytometrisch beurteilt. Abgebildet ist das Ergebnis für Wildtypzellen und für Transfektion mit dem Leervektor sowie CD133-Vektor. Das Diagramm der korrespondierenden Isotypenkontrolle ist jeweils unter dem der Probe mit CD133-Antikörper (AC133, Miltenyi) abgebildet. **(B)** RT-PCR-Ergebnisse für HeLa-CD133^{transfiziert} und HeLa-Ø hinsichtlich differentieller Genexpression. In HEK293-CD133^{high}-Zellen waren nach den Ergebnissen des Microarrays BACE2, CELF2, CNN2, DUSP5, FERMT1, GATA2, RBP7, ZNF91 und ZNF420 heraufreguliert und BAI3, DECR1 und RUNX3 herunterreguliert. Als Ladekontrolle diente GAPDH. Die Abbildung zeigt das Ergebnis der RT-PCR und Gelelektrophorese eines Experiments. Durchgeführt wurden drei unabhängige Experimente mit gleichen Resultaten.

Aus den zwei Zelllinien wurde im Anschluss RNA extrahiert und die in HEK293-CD133^{high/low}-Zellen beobachteten Unterschiede in der Expression einzelner Gene auf mRNA-Ebene überprüft. Trotz der teilweise sehr deutlichen Unterschiede in HEK293-CD133^{high/low}-Zellen ergab der Vergleich eben dieser Gene in HeLa-CD133^{transfiziert}- und HeLa-Ø-Zellen in drei unabhängigen Versuchsansätzen keinen Unterschied für die meisten untersuchten Gene (Abb. 4-13; B). Dies war der Fall für BACE2, BAI3, CNN2, DUSP5, FERMT1, GATA2, RBP7, ZNF91 und ZNF420. Die Regulation von DECR1 schien eher entgegengesetzt der Regulation in HEK293-CD133^{high/low}-Zellen zu sein, da anstatt einer Herunterregulation eine etwas stärkere Bande bei HeLa-CD133^{transfiziert}-Zellen zu erkennen war. CELF2 konnte in keinem Versuch mit HeLa-CD133^{transfiziert}- und HeLa-Ø-Zellen nachgewiesen werden. Bei RUNX3 ließ sich jeweils ein geringer Unterschied in der Intensität der Bande feststellen, der einer weiteren Validierung mittels sensitiverer Methoden bedarf.

5 Diskussion

Nachdem das Glykoprotein CD133 1997 in humanen hämatopoetischen Stammzellen beschrieben wurde (Miraglia, Godfrey et al. 1997), rückte es in den folgenden Jahren zunehmend in den Fokus der Forschung. CD133 konnte in einer Vielzahl muriner und humaner Gewebe nachgewiesen werden, wobei das Protein insbesondere in der Embryonal- und Fetalphase zu detektieren war, in adultem Gewebe gleichen Ursprungs, beispielsweise in Gehirn, Kolon oder Niere, meist jedoch nicht mehr (Corbeil, Roper et al. 2001). Teilweise lässt sich dies auf ein verändertes Glykosylierungsmuster und damit eine verminderte Detektion des Epitops AC133 zurückführen (Kemper, Sprick et al. 2010). Studien mit Antikörpern gegen glykosylierungsunabhängige Epitope konnten eine stärkere Verbreitung der CD133-Expression in adulten Geweben zeigen (Florek, Haase et al. 2005).

Im Weiteren konnte demonstriert werden, dass insbesondere hämatopoetische und neuronale Stammzellen präferentiell glykosyliertes CD133 exprimieren und daher mithilfe von Antikörpern gegen das AC133-Epitop in vielen Fällen Stammzellen isolierbar sind (Yin, Miraglia et al. 1997; Uchida, Buck et al. 2000). Als einer der ersten Marker wurde CD133 ebenfalls herangezogen, um in soliden Tumoren CSC-Populationen zu identifizieren (Singh, Clarke et al. 2003), in denen die Anzahl Tumor-initiierender Zellen deutlich gesteigert war (O'Brien, Pollett et al. 2007). Trotz teils widersprüchlicher Studienergebnisse hinsichtlich der Qualität von CD133 als Marker für Tumorstammzellen (Shmelkov, Butler et al. 2008), hat sich vor allem die Verwendung des Epitops AC133 zur Identifizierung von CSCs etabliert.

Obwohl in einigen Tumorentitäten eine Assoziation von CD133-Expression mit schlechterem Gesamtüberleben (Horst, Kriegl et al. 2008) oder erhöhter Therapieresistenz (Bao, Wu et al. 2006) nachgewiesen wurde, ist bisher unklar, welche Funktion CD133 hierbei zukommt. Kürzlich konnten Interaktionen von CD133 mit der Src-Kinase nachgewiesen werden (Boivin, Labbe et al. 2009). Dadurch kommt es zu einer verstärkten Induktion von EMT, da die Src-Kinase in aktiver, phosphorylierter Form, wie sie in CD133-überexprimierenden Zellen bevorzugt vorkommt (Chen, Wu et al. 2011), ein potenter EMT-Induktor ist, indem es die E-cadherin-Expression reduziert (Mandal, Myers et al. 2008). Dies hat Auswirkungen auf Tumorigenität und Ausprägung von Stammzeleigenschaften und bietet somit einen Erklärungsansatz für die erwähnten klinischen Beobachtungen.

Um weitere Einblicke in die Auswirkungen von CD133 auf Zelleigenschaften zu erhalten, wurde daher in dieser Arbeit versucht, Zellen mit stabiler, ektopischer CD133-Expression zu generieren. Die Charakterisierung dieser Zellen hinsichtlich verschiedener Eigenschaften *in vivo* und *in vitro* sollte dazu dienen, Eigenschaften, welche in CD133⁺ Zellen beobachtet wurden, an einer Zellpopulation zu evaluieren, die primär eine geringere Fähigkeit zur Bildung von Tumoren besitzt und nicht der Subpopulation eines Primärtumors im Sinne von CSCs entstammt. Darüber hinaus wurde das Ziel verfolgt, Erklärungsansätze für die beobachteten Eigenschaften von CD133⁺ Zellen zu finden und mögliche Zielgene von CD133 zu identifizieren.

5.1 CD133-Expression in Karzinomzelllinien und HEK293-Wildtypzellen

Zunächst erfolgte eine Charakterisierung verschiedener etablierter Zelllinien hinsichtlich ihrer CD133-Expression. Insbesondere aufgrund der zuvor erwähnten Differenzen zwischen Detektion auf mRNA- und Proteinebene wurden sowohl Methoden zur Protein- als auch zur mRNA-Detektion angewendet. Dabei konnte gesehen werden, dass in der Mehrzahl der untersuchten Karzinomzelllinien (FaDu,

HeLa, OSC-19, PCI-1) keine CD133-Expression auf Proteinebene mit dem AC133-Antikörper (Miltenyi) oder auf mRNA-Ebene nachweisbar war. Es konnten also keine Unterschiede zwischen mRNA- und Proteindetektion festgestellt werden. Caco-2-Zellen, von denen bekannt ist, dass sie eine starke CD133-Expression aufweisen, waren auch in dieser Untersuchung hoch positiv auf CD133-Protein und mRNA, wobei durchflusszytometrisch kaum Zellen mit niedriger CD133-Expression zu detektieren waren, sondern eine homogen hohe Fluoreszenz ohne breite Verteilung. HEK293-Zellen zeigten zwar eine gering erhöhte mittlere Fluoreszenzintensität in der Durchflusszytometrie, aber nachdem weder proteinbiochemisch noch mit der sensitiveren RT-PCR CD133 detektierbar war, kann man davon ausgehen, dass HEK293-Wildtypzellen keine endogene CD133-Expression zeigen und die erhöhte MFI am ehesten auf unspezifische Bindungen zurückzuführen ist.

Insgesamt zeigt diese Untersuchung, dass die CD133-Expression zwischen einzelnen Zelllinien stark variieren kann, aber innerhalb der einzelnen Zelllinien stabil ist, nachdem die mittlere Fluoreszenz zwischen den einzelnen Versuchen konstant blieb. Große interindividuelle Unterschiede des Expressionsmusters wurden auch bei Untersuchungen von Tumormustern der gleichen Entität festgestellt werden, zum Beispiel in Kolonkarzinomen (Choi, Lee et al. 2009), wobei auch hier ein Großteil der Proben keinerlei CD133-Expression zeigte.

5.2 Magnet-assistierte Transfektion verschiedener Zelllinien

Da der Effekt von ektopischer CD133-Überexpression bisher nur wenig verstanden ist, sollten stabile Transfektanten verschiedener Karzinomzelllinien mit CD133 etabliert werden. Es konnte jedoch weder in FaDu, PCI-1 noch HCT-8 eine stabile CD133-Expression mittels Magnet-assistierter Transfektion erreicht werden, die dauerhaft mit einem Antikörper gegen das AC133-Epitop detektierbar war. Der schon initial sehr geringe Transfektionserfolg ging trotz eukaryoziden Selektionsdruckes in allen Fällen stetig bis auf das Ausgangsniveau entsprechender Wildtypzellen zurück. Transfektion dieser Zellen nach gleichem Protokoll mit einem GFP-exprimierenden Vektor zeigten hingegen eine höhere Transfektionseffizienz. Die Beobachtung, dass mRNA-Transkripte von CD133 auch dann noch detektierbar waren, wenn durchflusszytometrisch kein CD133-Nachweis mehr möglich war, zeigt, dass die Transkription der CD133-cDNA vom Expressionsplasmid weiterhin erfolgte. Diese Diskrepanz zwischen Detektion auf mRNA- und Proteinebene wurde ebenfalls für verschiedene primäre Gewebe, beispielsweise Kolon oder Niere, beschrieben. Hierbei war die CD133-Proteinexpression insbesondere in fetalen Geweben ausgeprägt. In den meisten adulten Geweben hingegen gelang keine Detektion des AC133-Epitops, oftmals war jedoch CD133-Transkription nachweisbar (Miraglia, Godfrey et al. 1997; Corbeil, Roper et al. 2001; Lardon, Corbeil et al. 2008). Der vermeintliche Rückgang der CD133-Expression ist zumindest teilweise durch eine veränderte Glykosylierung des Proteins während der Entwicklung der verschiedenen Gewebe zu erklären. Es wird vermutet, dass dies zu Veränderungen der Tertiärstruktur von CD133 führt, wodurch das AC133-Epitop nicht mehr detektiert werden kann (Kemper, Sprick et al. 2010). Mit der Verwendung von Antikörpern, welche gegen andere Epitope von CD133 gerichtet sind, konnte eine stärkere Verbreitung der CD133-Proteinexpression nachgewiesen werden als mit Antikörpern gegen das AC133-Epitop (Florek, Haase et al. 2005; Karbanova, Missol-Kolka et al. 2008). Ob dies jedoch für Zellen, die mit einem CD133-Expressionsplasmid transfiziert wurden, ebenfalls gilt, ist fraglich. Beispielsweise in HEK293-Zellen, die mit einem CD133-Plasmid transfiziert wurden und durchflusszytometrisch keine verstärkte CD133-Expression aufwiesen, konnte vor und nach Deglykosylierung mit PNGase F proteinbiochemisch mit dem AC133-Antikörper (Miltenyi) kein CD133 nachgewiesen werden, obwohl auch hier CD133-mRNA detektierbar war. Andererseits hatte in

HEK293-Zellen mit messbarer ektoptischer CD133-Expression die Abspaltung der N-Glykosylreste keinen Einfluss auf die AC133-Epitopdetektion, das heißt, es konnte sowohl vor, als auch nach Deglykosylierung AC133 detektiert werden. Dies spricht dafür, dass eine Änderung der Glykosylierung nicht der einzige Faktor ist, der Einfluss auf die AC133-Detektion nimmt.

Verschiedene weitere Mechanismen kommen in Betracht, die eine Reduktion der CD133-Expression erklären könnten. Bei der Insertion des Plasmids in das Genom der Zelle könnte es zu einer Öffnung und Linearisierung der zirkulären DNA im Bereich der CD133-cDNA kommen, was eine fehlerhafte Transkription nach sich ziehen würde. Da jedoch initial nach Transfektion CD133 korrekt detektiert wurde und erst im Verlauf zurückging, ist diese Möglichkeit ebenfalls unwahrscheinlich. Eine weitere Möglichkeit, die eine Detektion von mRNA-Transkripten, nicht jedoch von Protein erlauben würde, besteht darin, dass es nach Transkription nicht zur Translation kommt. Dies kann beispielsweise über miRNAs oder siRNAs erzielt werden, die eine Degradation von mRNA durch Endonukleasen einleiten können, das *decapping*, und damit letztlich die Degradierung von mRNA beschleunigen oder zu einer Translationsrepression führen können (Valencia-Sanchez, Liu et al. 2006; Hu and Collier 2012). Diese Mechanismen könnten zu einer Reduktion der Proteinsynthese und damit zu einer verminderten AC133-Detektion bei fortwährendem CD133-mRNA-Nachweis führen, obwohl der Selektionsdruck auf die Zellen zur korrekten Expression des Neomycin-Resistenzgens weiterhin besteht. Zudem besteht die Möglichkeit, dass es bei ektoptischer Expression zu einer Störung der subzellulären Lokalisation von CD133 kommt und das Protein beispielsweise intrazellulär verbleibt, anstatt korrekt in die Zellmembran integriert zu werden und dadurch einer Detektion in der Durchflusszytometrie entgeht. Röper *et al.* zeigten, dass die Lokalisation von CD133 in Mikrodomänen der Zellmembran ein komplexer Prozess ist, der eine Assoziation mit Cholesterol schon im Bereich des trans-Golgi-Netzwerks erfordert (Roper, Corbeil et al. 2000). Möglicherweise ist dieser Vorgang also bei ektoptischer Expression gestört. Eine korrekte Lokalisation von ektoptisch exprimiertem CD133 in der Zellmembran ist jedoch zumindest temporär möglich, da eine Detektion des AC133-Epitops in verschiedenen transfizierten Zelllinien in der Durchflusszytometrie mit nicht-permeabilisierten Zellen erfolgreich war.

Da, wie zuvor dargelegt, mittels konventioneller Transfektionsmethoden oftmals nur eine geringe CD133-Transfektionseffizienz zu erzielen ist, wurden kürzlich in Untersuchungen alternative Möglichkeiten zur Etablierung stabiler ektoptischer CD133-Expression verwendet. Hierbei kam die virale Transduktion als eine weitere Möglichkeit des Gentransfers zur Anwendung, welche zumeist bei nicht transformierten oder nicht mitotisch aktiven Zellen verwendet wird. Mit dieser Methode gelang es, stabil hohe ektoptische CD133-Expressionsraten zu erzielen (Chen, Wu et al. 2011; Mak, Blakely et al. 2011).

5.3 Etablierung stabiler CD133-Expression in HEK293-Zellen

Neben verschiedenen Karzinomzelllinien wurde ebenso die seit langem etablierte und effizient transfizierbare Zelllinie HEK293 verwendet (Graham, Smiley et al. 1977). Im Vergleich zu den zuvor verwendeten Karzinomzelllinien konnte in einer Subpopulation dieser Zellen eine stabile und starke CD133-Expression nach Transfektion beobachtet werden. Dass diese Expression endogenen Ursprungs ist, ist unwahrscheinlich, nachdem in Wildtypzellen zuvor kein eindeutiger Nachweis von CD133-mRNA oder -Protein möglich war.

Aus diesen transfizierten HEK293-Zellen wurden mittels durchflusszytometrischer Isolierung HEK293-Zellen mit hoher und nahezu fehlender CD133-Expression gewonnen. Anschließend wurde die

Oberflächenexpression von CD133 im zeitlichen Verlauf evaluiert. Die beobachtete MFI für CD133 blieb in beiden Populationen konstant. Da die CD133-Expression dieser Zellen nicht über einen endogenen Promotor ablief, konnten folglich nicht beobachtet werden, dass die Expression mit zunehmender Konfluenz der Zellen absinkt, wie es für Caco-2-Zellen beschrieben wurde (Corbeil, Roper et al. 2001). Ferner war erwartungsgemäß keine Ausbildung von CD133⁺ Subpopulationen zu beobachten, was nach Isolation von CD133⁺ Zellen aus primären Tumoren der Fall ist (O'Brien, Pollett et al. 2007; Ricci-Vitiani, Lombardi et al. 2007).

5.4 Charakterisierung der CD133-Expression in HEK293-CD133^{high/low}-Zellen

CD133 liegt in der Regel in stark glykosylierter Form vor und ist insbesondere in Protrusionen der Zellmembran zu finden. In HEK293-CD133^{high}-Zellen ließ sich ebenfalls beobachten, dass CD133 zumindest teilweise membranständig lokalisiert ist, nachdem es durchflusszytometrisch zuverlässig in nicht-permeabilisierten Zellen detektiert werden konnte.

Im Weiteren konnte gezeigt werden, dass CD133 in HEK293-CD133^{high}-Zellen ähnlich wie in Caco-2-Zellen glykosyliert wird. Erste Hinweise hierauf ergaben sich aus der Beobachtung, dass sich CD133 proteinbiochemisch in HEK293-CD133^{high}-Zellen im gleichen Bereich des Molekulargewichts wie in Caco-2-Zellen detektieren ließ. Hierbei konnte mit zwei verschiedenen Antikörpern (W6B3C1; C24B9) gegen Epitope der zweiten Extrazellulärschleife identische Ergebnisse erreicht werden. Es ließ sich anschließend nachweisen, dass in HEK293-CD133^{high}-Zellen hauptsächlich N-Glykosylierung für das erhöhte Molekulargewicht des posttranslational modifizierten Proteins verantwortlich ist, da es nach Inkubation der Zelllysate mit PNGase F zu einer deutlichen Reduktion des Molekulargewichts auf Werte des unmodifizierten Proteins kam. Diese Ergebnisse wurden sowohl für HEK293-CD133^{high}-Zellen als auch für Caco-2-Zellen erzielt und stehen im Einklang mit dem Ergebnis anderer Untersuchungen, die ebenfalls zeigten, dass eine zentrale posttranslationale Modifikation von CD133 in der N-Glykosylierung besteht (Corbeil, Roper et al. 2000). Eine Maskierung des AC133-Epitops durch Glykosylreste könnte zu einer verminderten CD133-Detektion in HEK293-CD133^{low}-Zellen beitragen, die zwar mit einem CD133-Expressionsplasmid transfiziert wurden, aber kaum CD133-Protein exprimieren. Nachdem jedoch auch die CD133-mRNA-Expression dieser Zellen deutlich erniedrigt war und weder mit unterschiedlichen Primärantikörpern (W6B3C1; C24B9) noch nach Deglykosylierung von HEK293-CD133^{low}-Zelllysaten eine Detektion von CD133 möglich war, erscheint diese Möglichkeit unwahrscheinlich, ebenso wie eine intrazelluläre CD133-Retention. Es lässt sich daher zusammenfassen, dass in HEK293-Zellen ektopisch exprimiertes CD133 in essentiellen Eigenschaften wie der subzellulären Lokalisation und der Glykosylierung mit endogen exprimiertem CD133 in Caco-2-Zellen übereinstimmt. Ferner exprimieren in der HEK293-CD133^{low}-Population erwartungsgemäß nur einzelne Zellen stark CD133.

5.5 Wachstumsverhalten von HEK293-CD133^{high/low}-Zellen *in vitro*

Um festzustellen, ob ektopisch exprimiertes CD133 in HEK293-Zellen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Zellen hat, wurde das Wachstum unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Es zeigte sich, dass sich die Proliferationsrate von HEK293-CD133^{high/low}-Zellen in gleicher Weise verringert, wenn die Serumsupplementierung von 10% FCS auf 3% reduziert wird. Ebenso ließ sich beobachten, dass kein signifikanter Unterschied zwischen HEK293-CD133^{high}- und HEK293-CD133^{low}-Zellen hinsichtlich der Wachstumsraten bei gleicher FCS-Supplementierung besteht. Hierbei ließ sich allein der Trend einer schwach gesteigerten Proliferation von HEK293-CD133^{low}-Zellen im

Vergleich zu HEK293-CD133^{high}-Zellen nach drei bis vier Tagen feststellen. *In vitro* konnte in HEK293-Zellen folglich kein vorteilhafter Effekt von CD133-Expression auf Proliferation und Unabhängigkeit von wachstumsstimulierenden Faktoren gefunden werden.

Eine genauere Betrachtung des Proliferationsverhaltens und der Reaktion von HEK293-CD133^{high/low}-Zellen auf eine Änderung der Wachstumsbedingungen erfolgte anhand der Analyse der Zellzyklusverteilung. Wie nach den zuvor beschriebenen Ergebnissen zu erwarten war, unterschieden sich die zwei Populationen nicht substantiell in ihrer Zellzyklusverteilung unter 10% FCS. Durch eine Reduktion des FCS-Gehalts auf 0,1% konnten ebenso wenig Unterschiede im Proliferationsverhalten beider Zelllinien hervorgerufen werden. Obwohl Serumentzug in Zellen oftmals zu einem reversiblen Zellzyklusarrest (Synchronisation der Zellen in der G₁/G₀-Phase) führt (Davis, Ho et al. 2001), war dies weder bei HEK293-CD133^{high}- noch bei HEK293-CD133^{low}-Zellen zu sehen. Dass dieser Effekt nicht zu beobachten war, kann möglicherweise auch mit der Dauer des Serumentzugs zusammenhängen, die in dieser Arbeit bei 22 Stunden lag. Andere Untersuchungen mit HEK293-Zellen konnten jedoch auch schon nach einer Dauer von 14 Stunden Serumentzug einen Zellzyklusarrest in der G₁/G₀-Phase beobachten (Cude, Wang et al. 2007). Ferner zeigte sich zwischen HEK293-CD133^{high}- und HEK293-CD133^{low}-Zellen kein klarer Unterschied in der Zellzyklusverteilung nach erneuter Zugabe von 10% FCS nach Serumentzug. Einzig in der Analyse 10 Stunden nach erneuter Zugabe von 10% FCS konnte ein schwacher Trend dahingehend gesehen werden, dass der Prozentsatz von Zellen in der S-Phase in der HEK293-CD133^{low}-Zellpopulation leicht erhöht war, was die zuvor beobachtete, marginal gesteigerte Proliferation dieser Zellen erklären könnte. Dieser Trend stellt möglicherweise eine verzögerte Reaktion auf die vorhergehende Manipulation der Wachstumsbedingungen dar. Nachdem schon Serumreduktion auf 0,1% FCS für 22 Stunden keine Unterschiede zu den Ergebnissen bei 10% FCS hervorgerufen hatte, war jedoch zu erwarten, dass auch die erneute Zugabe von FCS zu keinem substantiellen Effekt im Hinblick auf die Zellzyklusverteilung führen würde.

Insgesamt decken sich diese Beobachtungen mit den Ergebnissen anderer Studien, die mit etablierten Zelllinien erzielt wurden. Hierbei wurden Kolonkarzinom-Zelllinien, die endogen CD133 exprimierten, mit CD133-spezifischer siRNA transfiziert. Zwei unabhängig voneinander durchgeführte Studien zeigten, dass der dadurch herbeigeführte *knock down* von CD133 in den untersuchten Zelllinien ebenfalls keinen Einfluss auf Zellproliferation bei Supplementierung von 10% respektive 7,5% FCS hat (Horst, Scheel et al. 2009; Elsaba, Martinez-Pomares et al. 2010). Aus diesen Ergebnissen lassen sich daher keine Rückschlüsse auf eine mögliche funktionelle Relevanz von CD133 ziehen, welche Erklärungsansätze beispielsweise für die Assoziation von CD133 in Tumoren mit schlechtem Gesamtüberleben bieten könnten.

Neben einer Steigerung der Proliferation von Zellen kommen einige andere Zelleigenschaften in Frage, die zu einem erhöhten malignen Potential von Tumoren beitragen und letztendlich das klinische Erscheinungsbild der Krebserkrankung prägen können. Hierzu zählen zum Beispiel eine gesteigerte Fähigkeit zur Migration und Invasion, welche in der Folge zu verstärkter Gewebsinvasion oder Metastasierung führen können. Diese Eigenschaften, die man auch CSCs zuschreibt (Scheel and Weinberg 2012), wurden an verschiedenen Karzinomzelllinien mit endogener oder ektoptischer CD133-Expression evaluiert, nicht jedoch an primär nicht-malignen Zellen. Dabei wurden teilweise mit konträren Ergebnissen Zelllinien aus Kolonkarzinomen sowie aus Kopf-Hals-Tumoren untersucht, die keine CD133-exprimierenden Zellen aus Primärtumoren im Sinne von CSC-Populationen darstellen. Zwar konnten Chen *et al.* eine verstärkte Invasivität von HNSCC-Zellen mit ektoptischer CD133-Überexpression feststellen (Chen, Wu et al. 2011), eine Untersuchung von

Kolonkarzinomzelllinien mit *knock down* von CD133 fand hingegen keinen Einfluss von CD133 auf Invasivität oder Migration (Horst, Scheel et al. 2009). Dass jedoch CD133⁺ Zellen weiterer Kolonkarzinomzelllinien verstärkt zu Migration fähig sein können, demonstriert eine weitere Studie (Elsaba, Martinez-Pomares et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit konnte in Versuchen mit Boyden-Kammern und mittels *scratch assay* weder in der HEK293-CD133^{high}- noch in der HEK293-CD133^{low}-Population Zellmigration nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass erhöhte CD133-Expression zumindest in HEK293-Zellen keinen Unterschied in Chemotaxis oder Migrationsverhalten bewirken kann.

5.6 HEK293-CD133^{high}-Zellen zeigen erhöhte Tumorinduktion und Proliferation *in vivo*

Im Zuge der Erforschung der Tumorstammzelltheorie erlangte die Evaluation der Tumorigenität von Zellen zunehmend Bedeutung: Durch Xenotransplantationsmodelle, bei denen Zellen in immuninkompetente Mäuse injiziert werden, erfolgt die Identifikation tumorigener Zellen, welche in einigen Tumorentitäten als CSCs nur einen Teil der Gesamtpopulation darstellen und sich oftmals durch geeignete Oberflächenmarker identifizieren lassen. Mit diesem Ansatz ist es jedoch nur schwer möglich, die Funktion eines einzelnen Markerproteins von CSCs zu beurteilen. Auch wenn sich durch einen bestimmten Marker CSCs identifizieren lassen, kann man dennoch keine funktionelle Relevanz dieser Proteine hinsichtlich der CSC-Eigenschaften ableiten. Deshalb wurde der Einfluss von CD133 auf Tumorigenität in dieser Arbeit nach ektopischer CD133-Überexpression in HEK293-Zellen untersucht. HEK293-Wildtypzellen sind primär nicht tumorigen, es konnte jedoch demonstriert werden, dass sie nach mehr als 65 Passagen in Zellkultur Tumoren mit einem malignen Phänotyp in immuninkompetenten Mäusen ausbilden können, was bei 52 Passagen noch nicht der Fall war (Shen, Gu et al. 2008). Die Anzahl der Passagen der in dieser Arbeit für Tumorinduktionsversuche verwendeten Zellen lag jeweils unter 35.

Bei subkutaner Injektion von HEK293-CD133^{high/low}-Zellen in NOD/SCID-Mäuse wurde ersichtlich, dass das tumorigene Potential der HEK293-CD133^{high}-Population im Vergleich zur HEK293-CD133^{low}-Population deutlich erhöht ist. Die Injektion verschiedener Zellzahlen von HEK293-CD133^{high}-Zellen hatte zuverlässig eine Tumorformation zur Folge (97% der Fälle), wohingegen HEK293-CD133^{low}-Zellen nur in 7% Tumoren bildeten, und dies nur bei Injektion der höchsten Zellzahl. Zudem stieg das mittlere Gewicht entnommener HEK293-CD133^{high}-Tumoren mit zunehmender Anzahl injizierter Zellen an. Da 5·10³ HEK293-CD133^{low}-Zellen auch 36 Tage nach Injektion im Gegensatz zu HEK293-CD133^{high}-Zellen noch keine Tumorformation zeigten, ist es unwahrscheinlich, dass der beobachtete Unterschied in der Tumorbildung allein durch langsamere Proliferation *in vivo* zu erklären ist. Insgesamt sprechen die erzielten Ergebnisse daher dafür, dass CD133 in HEK293-Zellen das *engraftment* der Zellen im Mausgewebe beeinflusst und somit möglicherweise auch im Menschen eine Rolle bei der Initiierung von Malignomen spielen könnte statt ausschließlich eine Funktion als Marker für CSCs zu besitzen.

Nachdem auch bei HEK293-CD133^{low}-Zellen ein geringes Potential zur Tumorformation vorhanden war, müssen in dieser Population ebenfalls einzelne Zellen in der Lage sein, Tumoren zu bilden. Hierfür könnten Zellen mit starker CD133-Positivität verantwortlich sein, die in der Immunzytochemie und Durchflusszytometrie in dieser Zellpopulation nachweisbar waren. Es ist jedoch durchaus möglich, dass andere Zellen außer den CD133⁺ Zellen für die Tumorformation entscheidend sind, nachdem die entnommenen Tumoren ebenfalls nur einzelne CD133⁺ Zellen in der immunhistochemischen Auswertung aufwiesen, HEK293-CD133^{high}-Tumoren hingegen eine

homogene, starke Färbung für CD133. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass es im Laufe der Tumorbildung durch HEK293-CD133^{low}-Zellen zu einer Herabregulation von CD133 in den einzelnen CD133⁺ Zellen nach der Tumorbildung kommt, wie es bei Tumorbildung durch CSCs zu beobachten ist. O'Brien *et al.* berichteten, dass auch ein Anteil von 5-15% schwächer CD133-exprimierender Kolonkarzinomzellen zu keiner verstärkten Tumorformation führte (O'Brien, Pollett et al. 2007), was die These stützt, dass das Ausmaß der CD133-Positivität der einzelnen Zellen wichtig ist und erst ab einem gewissen Prozentsatz an CD133⁺ Zellen eine zuverlässige Tumorigenität möglich ist. Dies stünde im Einklang mit den Ergebnissen, die bei HEK293-CD133^{high/low}-Tumoren beobachtet wurden, da auch hier nur stark CD133-exprimierende Zellpopulationen zuverlässig Tumoren bildeten. Ob hierfür beispielsweise eine direkte Interaktion von CD133⁺ Zellen untereinander oder mit umgebenden Zellen essentiell ist, ist bisher unklar. Einen Hinweis hierauf ist die Beobachtung, dass unseparierte Zellpopulationen aus Kolonkarzinomen mit geringerer Effizienz und zu einem späteren Zeitpunkt zu Tumorformation *in vivo* führten als reine CD133⁺ Zellpopulationen dieser Tumoren, obwohl die absolute Anzahl an CD133⁺ Zellen in der unseparierten Zellpopulation höher war (Ricci-Vitiani, Lombardi et al. 2007).

Trotz eines unterschiedlichen Potentials zur Tumorformation werden bei erfolgreicher Tumorbildung in HEK293-CD133^{high/low}-Populationen ähnliche Proliferationsraten erreicht. Zwar liegt das Gewicht der entnommenen HEK293-CD133^{low}-Tumoren nur etwa bei dem der HEK293-CD133^{high}-Tumoren mit niedrigster injizierter Zellzahl, aber dennoch zeigt die immunhistochemische Färbung eine vergleichbar starke Färbung für den Proliferationsmarker Ki67. Eine andere Untersuchung mit CD133-überexprimierenden HNSCC-Zellen kam wiederum zu dem Ergebnis, dass CD133 in diesem Fall zu einer erhöhten Proliferation *in vivo* führt. Der Einfluss von CD133 auf das Tumorigenitätsverhalten konnte hierbei jedoch nicht beurteilt werden, da sowohl CD133-überexprimierende Zellen als auch CD133⁻ Zellen aus HNSCC in allen Fällen Tumoren bildeten (Chen, Wu et al. 2011).

Auch wenn sie in ihrer Anwendung weit verbreitet sind, muss bei Xenotransplantationsmodellen beachtet werden, dass Angaben zur Tumorigenität jeweils nur für das verwendete Modell gelten, also in diesem Fall NOD/SCID-Mäuse. NOD/SCID-Mäuse bilden zwar keine B- und T-Zellen aus, jedoch ein funktionsfähiges angeborenes Immunsystem mit natürlichen Killerzellen, was zur Folge hat, dass in der Regel ein bedeutender Anteil injizierter humaner Zellen abgetötet wird (Shackleton, Quintana et al. 2009). Es lässt sich schwer feststellen, ob ein Unterschied in der Tumorigenität zwischen tumorigenen und nicht-tumorigenen Zellen besteht, was die Interpretation der Ergebnisse erschweren kann. Dass der Grad der Immunsuppression das Tumorigenitätsverhalten maßgeblich beeinflusst und daher die Häufigkeit tumorigener Zellen unterschätzt werden kann, veranschaulicht eine Studie, die das Tumorigenitätsverhalten von Melanomzellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass bei Verwendung von NOD/SCID IL2Ry^{null}-Mäusen, welche weder B- und T-Zellen, noch natürliche Killerzellen ausbilden, die Häufigkeit tumorinduzierender Zellen aus dem Primärtumor 1:4 betrug und nicht, wie zuvor in NOD/SCID-Mäusen geschätzt, 1:10⁶. Zudem bildeten Zellen, die nicht der zuvor bestimmten CD133⁺ Subpopulation tumorigener Zellen angehörten, ebenfalls Tumoren (Quintana, Shackleton et al. 2008).

Ein weiteres Problem besteht darin, dass eine passende Interaktion zwischen murinen Liganden und humanen Rezeptoren, wie etwa bei Wachstumsfaktoren, nicht gewährleistet ist und die injizierten Zellen zudem in einem anderen TME als im menschlichen Körper sind, was das Tumorigenitätsverhalten ebenso beeinflussen kann (Magee, Piskounova et al. 2012).

Insgesamt kann man festhalten, dass die Anzahl Tumor-initiierender Zellen in der HEK293-CD133^{high}-Population um mindestens das 1000fache erhöht ist im Vergleich zur HEK293-CD133^{low}-Population, wenn man die Tumorbildung in NOD/SCID-Mäusen betrachtet. Dieses Resultat deutet auf eine funktionelle Relevanz des Proteins CD133 bei der Initiierung von Tumoren hin. Unabhängig von der Rolle als Tumorstammzellmarker ruft CD133 auch in primär nicht-malignen HEK293-Zellen eine Tumorbildung *in vivo* hervor. Dennoch bleibt die Frage zu klären, welche Veränderungen zu diesem Phänotyp führen, obwohl *in vitro* keine Auswirkungen der CD133-Überexpression in HEK293-Zellen auffällig waren. Hierbei kommen verschiedene Mechanismen in Frage, in die CD133 möglicherweise involviert ist.

Es war bei der Entnahme der Tumoren zu beobachten, dass HEK293-CD133^{high}-Tumoren eine ausgeprägte Gefäßversorgung zeigten. Die Induktion von Angiogenese ist eine wichtige Eigenschaft von Krebszellen, in die CD133 möglicherweise eingreift. CD133 ist insbesondere in schlecht vaskularisierten hypoxischen Bereichen (hypoxische Stammzellnische) von Glioblastomen exprimiert (Li, Bao et al. 2009) und durch Hypoxie kommt es zur vermehrten Expression von CD133 (Soeda, Park et al. 2009). Da CD133⁺ Glioblastomzellen zudem vermehrt VEGF freisetzen (Bao, Wu et al. 2006), das einen wichtigen Stimulus für Angiogenese darstellt, ist es folglich denkbar, dass CD133 aktiv an Regulationsprozessen der Tumorangio-genese beteiligt ist. Dieser komplexe Vorgang erfordert die Rekrutierung von Zellen des TME, vor allem von Endothelzellen. In perivaskulären Nischen von Glioblastomen konnte nachgewiesen werden, dass CD133⁺ Zellen (nestin⁺) spezifisch mit Endothelzellen interagieren. *In vivo* führte die Koinjektion von CD133⁺ CSCs mit Endothelzellen zudem zu einer verstärkten Tumorinitiierung (Calabrese, Poppleton et al. 2007), sodass eine funktionell wichtige Rolle von CD133 im Rahmen der Angiogenese denkbar ist.

Ob CD133 in HEK293-Zellen über EMT-Induktion zu einem maligneren Phänotyp beiträgt, ist fraglich, nachdem EMT insbesondere mit Migration und Invasion und weniger mit Tumorinitiierung in Verbindung gebracht wird. Chen *et al.* berichteten zwar, dass es in HNSCC-Zellen mit CD133-Überexpression eine EMT induziert wird, wobei die Interaktion der zytoplasmatischen CD133-Domäne mit Src, einer Tyrosinkinase, eine entscheidende Rolle spielt (Chen, Wu et al. 2011). Jedoch wurden diese Effekte in anderen Untersuchungen mit Kolonkarzinomen nicht beschrieben (Horst, Scheel et al. 2009) und bei HEK293-CD133^{high/low}-Zellen war ebenfalls kein Hinweis auf EMT zu erkennen, da es beispielsweise keine Veränderungen der Zellmorphologie gab und EMT-typische Marker (Vimentin, Fibronectin, N-cadherin) ebenfalls nicht differentiell reguliert waren (Microarray-Daten; hier nicht gezeigt). Daher ist diese Möglichkeit als Erklärung für die erhöhte Tumorinitiierungsrate unwahrscheinlich.

Aufgrund der fast ausschließlichen Lokalisation in Protrusionen der Zellmembran und des Nachweises von Membranpartikeln, die vermehrt CD133 enthalten und von umgebenden Zellen aufgenommen werden, liegt die Vermutung nahe, dass CD133 an der Interaktion zwischen Zellen beteiligt ist. Welcher Art mögliche Interaktionen sind, ist aber bisher nicht hinreichend geklärt. Wie zuvor schon erwähnt, können CD133⁺ Zellen in verschiedener Weise mit umgebenden Zellen interagieren und dadurch das Tumorstadium *in vivo* beeinflussen. Dies wird auch durch die Beobachtung unterstrichen, dass CD133⁺ Kolonkarzinomzellen in Anwesenheit CD10⁺ Fibroblasten (CAFs) verstärkte Invasivität *in vitro* und erhöhtes Tumorstadium *in vivo* zeigen (Cui, Ohuchida et al. 2010). Auch wenn die Rolle von CD133 selbst in diesem Zusammenhang noch nicht ausreichend verstanden ist, ist es wahrscheinlich, dass es eine Funktion bei der Interaktion mit anderen Zellen des

Tumors und des TME ausübt. Dies könnte einen plausiblen Erklärungsansatz für das beobachtete Verhalten der HEK293-CD133^{high}-Zellen *in vivo* bieten.

5.7 Identifikation möglicher Zielgene von CD133 in HEK293-Zellen

Zur Identifikation möglicher Zielgene von CD133 und regulierter zellulärer Prozesse in HEK293-CD133^{high}-Zellen, die eine Erklärungsansatz für den beobachteten Phänotyp der Zellen bieten könnten, wurde eine Microarray-Analyse der HEK293-CD133^{high/low}-Zellen durchgeführt. Es war zunächst zu erkennen, dass es in HEK293-CD133^{high/low}-Zellen auf mRNA-Ebene keine signifikanten Regulationsunterschiede wichtiger Tumorstammzellmarker (CD44, ALDH1, CD24, EpCAM, CD166) gab, wie schon für CD44 und EpCAM immunhistochemisch gezeigt wurde. Es konnte also neben der CD133-Expression kein bekanntes Markerprofil gefunden werden, mittels welchem in anderen Studien CSCs isoliert wurden. Starke Regulationsunterschiede waren hingegen auffällig in Bereichen von Genen, die in mRNA-Transkriptionsregulation, mRNA-Transkription, Zellproliferation und Differenzierung involviert sind. Es erfolgte anschließend eine Überprüfung der Arrayergebnisse einzelner stark regulierter Gene mittels RT-PCR. Hierbei ließen sich die Ergebnisse in fast allen Fällen bestätigen, für drei Gene (ZNF91, ZNF420, KLF11) mit relativ geringer Regulation (FC knapp über 2,0) konnte in der RT-PCR keine eindeutige Aussage getroffen werden. Dies liegt in erster Linie daran, dass geringe Expressionsunterschiede bei Verwendung der weniger sensitiven RT-PCR und Gelelektrophorese im Gegensatz zu *real time* PCR oder Arrayhybridisierung schwer zu detektieren sind.

Die untersuchten Gene sind an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt. Als Transkriptionsfaktoren sind CELF2, GATA2, ZNF91, ZNF420, KLF11 und RUNX3 in der Regulation der mRNA-Transkription involviert. Die β -Sekretase BACE2 kann das Amyloid Precursor Protein (APP) spalten und ist in einem Mammakarzinommodell in immuninkompetenten Mäusen verstärkt exprimiert (Xin, Stephans et al. 2000). CNN2 spielt in Endothelzellen bei der Angiogenese eine Rolle (Tang, Hu et al. 2006). Für DUSP5 konnten spezifische Interaktionen mit ERK1/2 MAP-Kinasen gezeigt werden (Kucharska, Rushworth et al. 2009), während FERMT1 an der Integrin-abhängigen Signaltransduktion (Harburger, Bouaouina et al. 2009) und in Keratinozyten an der Regulation der Migration und Zellpolarität beteiligt ist (Herz, Aumailley et al. 2006). DECR1, ein Hilfsenzym der β -Oxidation, zeigt eine verminderte Expression in Mammakarzinomen (Ursini-Siegel, Rajput et al. 2007). Im Hinblick auf das beobachtete Tumorentstehungsverhalten ist insbesondere RUNX3 interessant, das in einigen Tumorentitäten zu den Tumorsuppressorgenen (Bae and Choi 2004; Chen 2012) zählt. In *Runx3*^{-/-}-Mäusen kommt es spontan zur Ausbildung von Mammakarzinomen und zudem führt eine erhöhte RUNX3-Expression in MCF-7-Zellen zu einer verminderten Tumorigenität *in vivo* (Huang, Qu et al. 2012). Ein möglicher Verknüpfungspunkt mit CD133 besteht zusätzlich in der Beobachtung, dass unter hypoxischen Bedingungen in Magenkarzinomzellen die Transkription von RUNX3 vermindert wird (Lee, Kim et al. 2009). CD133 zeigt hierbei eine gegensätzliche Regulation (Soeda, Park et al. 2009). Darüber hinaus resultiert der Verlust von RUNX3 in Magenepithel spontan in EMT (Voon, Wang et al. 2012), wohingegen CD133 in HNSCC an der Induktion von EMT beteiligt sein kann (Chen, Wu et al. 2011). Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit der verminderten Expression von RUNX3 in HEK293-CD133^{high}-Zellen und könnten einen Erklärungsansatz für die erhöhte Tumorentstehungsrate von HEK293-CD133^{high}-Zellen bieten. Eine genauere Betrachtung des Zusammenhangs zwischen CD133 und RUNX3 sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

5.8 Vergleich der Microarray-Ergebnisse von HEK293-CD133^{high}-Zellen mit transient CD133-transfizierten HeLa-Zellen

Im Weiteren wurden die Regulationsergebnisse der potentiellen CD133-Zielgene in HEK293-CD133^{high/low}-Zellen in transient transfizierten HeLa-Zellen überprüft. Trotz der teilweise sehr ausgeprägten Regulationsunterschiede in HEK293-CD133^{high/low}-Zellen konnte zwischen HeLa-CD133^{transfiziert}- und HeLa-Ø-Zellen für die meisten untersuchten Gene kein klarer Regulationsunterschied auf mRNA-Ebene festgestellt werden. Der Großteil zeigte keine oder kaum differentielle Regulation, DECR1 zeigte eine Regulation konträr zu den in HEK293-CD133^{high/low}-Zellen erzielten Ergebnissen und RUNX3 war in HeLa-Ø-Zellen zwar heraufreguliert wie in HEK293-CD133^{low}-Zellen. Der sehr geringe beobachtete Regulationsunterschied für RUNX3 bedarf jedoch einer Verifikation anhand sensitiverer Methoden als der RT-PCR. Es kann verschiedene Gründe haben, dass eine Bestätigung der Ergebnisse aus HEK293-CD133^{high/low}-Zellen größtenteils nicht erfolgte. Methodisch ist, wie zuvor erwähnt, die konventionelle RT-PCR mit Gelelektrophorese einer *real time* PCR in Bezug auf Detektion gering ausgeprägter Unterschiede unterlegen. Es ist auch möglich, dass durch die im Vergleich zu HEK293-CD133^{high}-Zellen relativ geringe CD133-Expression in der HeLa-CD133^{transfiziert}-Population eine weniger deutliche Regulation der betrachteten Gene erfolgt. Möglicherweise unterscheidet sich jedoch auch die Funktion von CD133 in HEK293- und HeLa-Zellen, also embryonale Nierenzellen und Zervixkarzinomzellen, sodass die Überexpression von CD133 in HeLa-Zellen zu anderen Veränderungen im Transkriptom führt wie es bei HEK293-Zellen gesehen wurde.

6 Resümee und Ausblick

Das Glykoprotein CD133 gehört mit CD44 (Zoller 2011) und EpCAM (Gires, Klein et al. 2009) zu den am häufigsten untersuchten Tumorstammzellmarkern in soliden Tumoren. Obwohl es Hinweise gibt, dass es eine wichtige Rolle in Tumoren spielt und in mehreren Tumorentitäten mit einer schlechteren Prognose für die betroffenen Patienten assoziiert ist, ist die Funktion des Proteins auf zellulärer und molekularer Ebene bisher nur ungenügend verstanden. Fundierte Kenntnisse der Funktionsweise von CD133 wären im Hinblick auf zielgerichtete Therapieformen jedoch von essentieller Bedeutung.

Die vorliegende Arbeit diene in erster Linie der genauen Evaluation des Einflusses von CD133 auf die zellulären Eigenschaften von primär CD133⁺ Zellen. Die Transfektion von HEK293-Zellen mit CD133 führte zu einer starken CD133-Expression in einer kleinen Subpopulation der Zellen, welche durchflusszytometrisch isoliert wurde (HEK293-CD133^{high}). Im Vergleich zu Zellen mit sehr geringer CD133-Expression (HEK293-CD133^{low}) ließ sich in dieser Population dauerhaft eine hohe CD133-Detektion erzielen. Ektopisch überexprimiertes CD133 wurde in vergleichbarer Weise wie endogenes CD133 in Caco-2-Zellen posttranslational in Form einer N-Glykosylierung modifiziert und korrekt in die Zellmembran integriert. Die anschließende Charakterisierung der Zellen ergab, dass ektopische CD133-Expression in HEK293-Zellen auf zentrale Zelleigenschaften *in vitro* keinen Einfluss nimmt. Dies galt insbesondere für Zellproliferation, was in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen in Kolonkarzinomzelllinien ist (Horst, Scheel et al. 2009; Elsaba, Martinez-Pomares et al. 2010). Des Weiteren konnten in einer Zellzyklusanalyse keine Unterschiede in der Reaktion auf eine zeitlich begrenzte Reduktion der Stimulation mit Wachstumsfaktoren festgestellt werden. In HEK293-CD133^{high}- und HEK293-CD133^{low}-Zellen bewirkte zeitlich begrenzter Serumentzug gleichermaßen nur eine geringe Veränderung der Proliferation und damit keine messbare Reduktion des Anteils mitotisch aktiver Zellen. Hieraus konnten folglich keine Rückschlüsse auf mögliche Funktionen von CD133 bei der Initiierung und dem Wachstum maligner Tumoren gezogen werden. Ebenso wenig gelang es, Unterschiede in Migration oder Chemotaxis, die essentielle Eigenschaften bei Krebsprogression und Metastasierung darstellen (Roussos, Condeelis et al. 2011), zu finden. Auswirkungen auf Migration oder Invasion in CD133-überexprimierenden Karzinomzellen wurde zwar in der Literatur beschrieben (Elsaba, Martinez-Pomares et al. 2010; Chen, Wu et al. 2011), andere Autoren sahen diesen Effekt jedoch nicht (Horst, Scheel et al. 2009).

Die folgende Evaluation des Tumorinitiierungs- und Wachstumsverhaltens *in vivo* erfolgte durch Xenotransplantation der Zellen in NOD/SCID-Mäuse. Dabei konnte ein signifikanter und starker Unterschied in der Fähigkeit zur Tumorbildung beobachtet werden, da HEK293-CD133^{high}-Zellen bei Injektion verschiedener Zellzahlen zuverlässig Tumoren bildeten, deren Gewicht mit der Anzahl injizierter Zellen anstieg. Im Gegensatz dazu zeigten HEK293-CD133^{low}-Zellen ein deutlich geringeres Tumorinitiierungspotential, da nur bei Injektion der höchsten Zellzahl in zwei von zehn Fällen nach 21 Tagen Tumoren explantiert werden konnten, bei niedrigerer Zellzahl die Tumorbildung jedoch komplett ausblieb. Auch nach verlängerter Inkubationszeit (36 Tage) bei Injektion von $5 \cdot 10^3$ Zellen wurden keinen Tumoren generiert. Diese Ergebnisse ließen uns schlussfolgern, dass die Frequenz Tumor-initiierender Zellen innerhalb der HEK293-CD133^{high}-Zellpopulation bei Betrachtung des Tumorinitiierungsverhaltens in NOD/SCID-Mäusen um mindestens das 1000fache erhöht ist im Vergleich zur HEK293-CD133^{low}-Population. Dies deutet auf eine potentielle funktionelle Relevanz von CD133 im Bezug auf die Fähigkeit von HEK293-Zellen zur Tumorbildung hin, nachdem CD133-Expression den einzigen, von außen induzierten Unterschied zwischen HEK293-CD133^{high}- und HEK293-CD133^{low}-Zellen darstellte. Auch in Untersuchungen mit primärem Gewebe, insbesondere aus Kolon (O'Brien, Pollett et al. 2007) oder Gehirn (Singh, Hawkins et al. 2004), bei denen CD133 zur

Identifikation von CSCs herangezogen wurde, zeigten diese CD133⁺ Zellen ein gesteigertes Potential zur Tumormutation. Unabhängig von der Rolle als Tumorstammzellmarker wurde die Frage, ob CD133 *in vivo* möglicherweise essentiell an der Tumorentstehung beteiligt ist, bisher jedoch nicht hinreichend adressiert. Chen *et al.* sahen bei Versuchen mit CD133-überexprimierenden HNSCC-Zellen zwar eine verstärkte Proliferation *in vivo*, jedoch konnte der Einfluss auf Tumorentstehung nicht beurteilt werden, da unabhängig von der CD133-Expression in allen Fällen Tumoren entstanden (Chen, Wu et al. 2011). Nach der derzeitigen Datenlage und den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen gibt es zwar Hinweise auf die Funktion von CD133, die genaue Rolle des Proteins bei der Tumorentstehung kann aber noch nicht abschließend beurteilt werden.

Mittels Microarray-Analyse des Transkriptoms der HEK293-CD133^{high/low}-Zellen wurden im Anschluss regulierte Gene identifiziert. mRNA-Transkription, deren Regulation sowie Zellproliferation und Differenzierung waren stark differentiell regulierte Prozesse, welche das beobachtete Tumorentstehungsverhalten *in vivo* erklären könnten. Die mRNA-Expression einer Auswahl möglicher CD133-Zielgene wurde im folgenden an HEK293-CD133^{high/low}-Zellen mit weitgehend identischen Ergebnissen überprüft.

Eine zusätzliche Beurteilung der Expressionsmuster dieser Gene in transient mit CD133 transfizierten HeLa-Zellen anhand von konventioneller RT-PCR erbrachte keine eindeutigen Ergebnisse hinsichtlich differentieller Regulation. Ein geringer Unterschied konnte für RUNX3, einem Tumorsuppressorgen, festgestellt werden.

Um jedoch genaue Aussagen zum Einfluss von CD133 auf mögliche Zielgene in verschiedenen Zelllinien treffen zu können, ist es sinnvoll, mittels sensitiver Verfahren wie der quantitativen *real time* PCR differentielle Expressionsmuster zu evaluieren. Dies sollte Inhalt zukünftiger Experimente sein. Zudem böte es sich an, statt durch Transfektion der Zellen, die – außer im Fall von HEK293-Zellen - nur geringe CD133-Transfektionsraten zuließ, lentivirale Transduktion als effektivere Möglichkeit des Gentransfers zu verwenden. Dies ermöglicht hohe CD133-Expressionsraten, wie kürzlich gezeigt werden konnte. Eine Reversibilität des Einflusses von CD133 auf potentielle Zielgene ließe sich anhand von CD133-spezifischer RNA-Interferenz prüfen.

Eine weitere Fragestellung ergibt sich aus den *in vivo* beobachteten Resultaten. Zunächst könnte die Frage eruiert werden, ob eine direkte Interaktion zwischen CD133⁺ Zellen essentiell für eine Tumormutation ist oder ob hierbei beispielsweise eine Rekrutierung von Zellen des TME zu einer erhöhten Tumorentstehung führen könnte. Ein erster Versuch, der eine gewisse Unabhängigkeit von umgebenden TME-Zellen implizieren könnte und auf eine direkte Interaktion zwischen CD133⁺ Zellen hindeuten würde, ist die Beurteilung der Koloniebildung unter nicht-adhärenenten Bedingungen *in vitro*. Gleichfalls wäre es möglich, die Tumormutation von Zellpopulationen mit einem definierten Anteil an CD133⁺ Zellen *in vitro* und *in vivo* zu betrachten, was weiteren Aufschluss über den Stellenwert der Interaktion zwischen CD133⁺ Zellen für die Tumorentstehung geben könnte, sowie die Frage adressieren würde, ob Tumormutation erst ab einem bestimmten prozentualen Anteil stark CD133-exprimierender Zellen an der Gesamtpopulation ermöglicht wird, wie eine Untersuchung mit Kolonkarzinomzellen impliziert (Ricci-Vitiani, Lombardi et al. 2007).

Ein genaueres Verständnis der Rolle von CD133 auf funktioneller und molekularer Ebene im Rahmen von malignen Erkrankungen ist von großer Bedeutung, wenn man Erklärungen dafür finden möchte, dass CD133-Expression in Tumoren oftmals mit einem deutlich schlechteren Gesamtüberleben oder verstärkter Therapieresistenz assoziiert ist. Ein fundiertes Wissen über die Funktionen des Proteins

wäre auch eine essentielle Voraussetzung für die Entwicklung CD133-spezifischer antitumoröser Therapieansätze. Dass CD133 als Tumorstammzellmarker hierfür möglicherweise ein geeigneter Kandidat ist, zeigt sich daran, dass das Protein erstens eine vergleichsweise weite Verbreitung in unterschiedlichen Tumorentitäten besitzt und zweitens die physiologische Funktion des Proteins im menschlichen Organismus möglicherweise relativ begrenzt ist, da im *Prom1*^{-/-}-Mausmodell zwar eine progrediente retinale Degeneration zu beobachten ist, jedoch interessanterweise keine weiteren Auffälligkeiten (Zacchigna, Oh et al. 2009). Demzufolge könnte ein genaueres Verständnis der Funktion von CD133 einen wichtigen Baustein zu gezielteren und effektiveren Therapieansätzen bei einer Vielzahl maligner Erkrankungen bilden.

7 Literaturverzeichnis

- Al-Hajj, M., M. S. Wicha, et al. (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(7): 3983-3988.
- Alison, M. R., W. R. Lin, et al. (2012). "Cancer stem cells: in the line of fire." *Cancer Treat Rev* **38**(6): 589-598.
- Angelastro, J. M. and M. W. Lame (2010). "Overexpression of CD133 promotes drug resistance in C6 glioma cells." *Mol Cancer Res* **8**(8): 1105-1115.
- Arnold, U. and W. Pschyrembel (2013). _____ 2013.
- Artells, R., I. Moreno, et al. (2010). "Tumour CD133 mRNA expression and clinical outcome in surgically resected colorectal cancer patients." *Eur J Cancer* **46**(3): 642-649.
- Asahara, T. and A. Kawamoto (2004). "Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis." *Am J Physiol Cell Physiol* **287**(3): C572-579.
- Baba, T., P. A. Convery, et al. (2009). "Epigenetic regulation of CD133 and tumorigenicity of CD133+ ovarian cancer cells." *Oncogene* **28**(2): 209-218.
- Bae, S. C. and J. K. Choi (2004). "Tumor suppressor activity of RUNX3." *Oncogene* **23**(24): 4336-4340.
- Bao, S., Q. Wu, et al. (2006). "Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response." *Nature* **444**(7120): 756-760.
- Bao, S., Q. Wu, et al. (2006). "Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor." *Cancer Res* **66**(16): 7843-7848.
- Bauer, N., A. V. Fonseca, et al. (2008). "New insights into the cell biology of hematopoietic progenitors by studying prominin-1 (CD133)." *Cells Tissues Organs* **188**(1-2): 127-138.
- Bauer, N., M. Wilsch-Brauninger, et al. (2011). "Haematopoietic stem cell differentiation promotes the release of prominin-1/CD133-containing membrane vesicles--a role of the endocytic-exocytic pathway." *EMBO Mol Med* **3**(7): 398-409.
- Beier, D., P. Hau, et al. (2007). "CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles." *Cancer Res* **67**(9): 4010-4015.
- Beier, D., S. Rohrl, et al. (2008). "Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma." *Cancer Res* **68**(14): 5706-5715.
- Beier, D., J. Wischhusen, et al. (2008). "CD133 expression and cancer stem cells predict prognosis in high-grade oligodendroglial tumors." *Brain Pathol* **18**(3): 370-377.
- Berdasco, M. and M. Esteller (2010). "Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry." *Dev Cell* **19**(5): 698-711.
- Berx, G., E. Raspe, et al. (2007). "Pre-EMTing metastasis? Recapitulation of morphogenetic processes in cancer." *Clin Exp Metastasis* **24**(8): 587-597.
- Biddle, A., X. Liang, et al. (2011). "Cancer stem cells in squamous cell carcinoma switch between two distinct phenotypes that are preferentially migratory or proliferative." *Cancer Res* **71**(15): 5317-5326.
- Bleau, A. M., D. Hambarzumyan, et al. (2009). "PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells." *Cell Stem Cell* **4**(3): 226-235.
- Boivin, D., D. Labbe, et al. (2009). "The stem cell marker CD133 (prominin-1) is phosphorylated on cytoplasmic tyrosine-828 and tyrosine-852 by Src and Fyn tyrosine kinases." *Biochemistry* **48**(18): 3998-4007.
- Bonnet, D. and J. E. Dick (1997). "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." *Nat Med* **3**(7): 730-737.
- Bullock, M. D., A. E. Sayan, et al. (2012). "MicroRNAs: critical regulators of epithelial to mesenchymal (EMT) and mesenchymal to epithelial transition (MET) in cancer progression." *Biol Cell* **104**(1): 3-12.
- Burt, R. K., Y. Loh, et al. (2008). "Clinical applications of blood-derived and marrow-derived stem cells for nonmalignant diseases." *JAMA* **299**(8): 925-936.

- Bussolati, B., S. Bruno, et al. (2005). "Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney." *Am J Pathol* **166**(2): 545-555.
- Cahill, D. P., K. W. Kinzler, et al. (1999). "Genetic instability and darwinian selection in tumours." *Trends Cell Biol* **9**(12): M57-60.
- Cairns, J. (1975). "Mutation selection and the natural history of cancer." *Nature* **255**(5505): 197-200.
- Calabrese, C., H. Poppleton, et al. (2007). "A perivascular niche for brain tumor stem cells." *Cancer Cell* **11**(1): 69-82.
- Canis, M., A. Lechner, et al. (2012). "CD133 is a predictor of poor survival in head and neck squamous cell carcinomas." *Cancer Biomark* **12**(2): 97-105.
- Cardiff, R. D. (2005). "Epithelial to Mesenchymal Transition Tumors: Fallacious or Snail's Pace?" *Clin Cancer Res* **11**(24 Pt 1): 8534-8537.
- Carpenter, M. K., E. Rosler, et al. (2003). "Characterization and differentiation of human embryonic stem cells." *Cloning Stem Cells* **5**(1): 79-88.
- Chaffer, C. L., I. Brueckmann, et al. (2011). "Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(19): 7950-7955.
- Chen, L. F. (2012). "Tumor suppressor function of RUNX3 in breast cancer." *J Cell Biochem* **113**(5): 1470-1477.
- Chen, Y. C., H. S. Hsu, et al. (2008). "Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells." *PLoS One* **3**(7): e2637.
- Chen, Y. S., M. J. Wu, et al. (2011). "CD133/Src axis mediates tumor initiating property and epithelial-mesenchymal transition of head and neck cancer." *PLoS One* **6**(11): e28053.
- Chiou, S. H., C. C. Yu, et al. (2008). "Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma." *Clin Cancer Res* **14**(13): 4085-4095.
- Choi, D., H. W. Lee, et al. (2009). "Cancer stem cell markers CD133 and CD24 correlate with invasiveness and differentiation in colorectal adenocarcinoma." *World J Gastroenterol* **15**(18): 2258-2264.
- Chu, P., D. J. Clanton, et al. (2009). "Characterization of a subpopulation of colon cancer cells with stem cell-like properties." *Int J Cancer* **124**(6): 1312-1321.
- Collins, A. T., P. A. Berry, et al. (2005). "Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells." *Cancer Res* **65**(23): 10946-10951.
- Corbeil, D., A. Joester, et al. (2009). "Expression of distinct splice variants of the stem cell marker prominin-1 (CD133) in glial cells." *Glia* **57**(8): 860-874.
- Corbeil, D., A. M. Marzesco, et al. (2010). "The intriguing links between prominin-1 (CD133), cholesterol-based membrane microdomains, remodeling of apical plasma membrane protrusions, extracellular membrane particles, and (neuro)epithelial cell differentiation." *FEBS Lett* **584**(9): 1659-1664.
- Corbeil, D., K. Roper, et al. (2001). "Prominin: a story of cholesterol, plasma membrane protrusions and human pathology." *Traffic* **2**(2): 82-91.
- Corbeil, D., K. Roper, et al. (2000). "The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions." *J Biol Chem* **275**(8): 5512-5520.
- Corbeil, D., K. Roper, et al. (1998). "AC133 hematopoietic stem cell antigen: human homologue of mouse kidney prominin or distinct member of a novel protein family?" *Blood* **91**(7): 2625-2626.
- Corti, S., M. Nizzardo, et al. (2007). "Isolation and characterization of murine neural stem/progenitor cells based on Prominin-1 expression." *Exp Neurol* **205**(2): 547-562.
- Costa, W. H., R. M. Rocha, et al. (2012). "CD133 immunohistochemical expression predicts progression and cancer-related death in renal cell carcinoma." *World J Urol* **30**(4): 553-558.
- Crocker, A. K., D. Goodale, et al. (2009). "High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability." *J Cell Mol Med* **13**(8B): 2236-2252.
- Cude, K., Y. Wang, et al. (2007). "Regulation of the G2-M cell cycle progression by the ERK5-NFkappaB signaling pathway." *J Cell Biol* **177**(2): 253-264.

- Cui, K., C. Zang, et al. (2009). "Chromatin signatures in multipotent human hematopoietic stem cells indicate the fate of bivalent genes during differentiation." *Cell Stem Cell* **4**(1): 80-93.
- Cui, L., K. Ohuchida, et al. (2010). "Prospectively isolated cancer-associated CD10(+) fibroblasts have stronger interactions with CD133(+) colon cancer cells than with CD133(-) cancer cells." *PLoS One* **5**(8): e12121.
- Dalerba, P., R. W. Cho, et al. (2007). "Cancer stem cells: models and concepts." *Annu Rev Med* **58**: 267-284.
- Dalerba, P., S. J. Dylla, et al. (2007). "Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(24): 10158-10163.
- Davis, P. K., A. Ho, et al. (2001). "Biological methods for cell-cycle synchronization of mammalian cells." *Biotechniques* **30**(6): 1322-1326, 1328, 1330-1321.
- de Wynter, E. A., D. Buck, et al. (1998). "CD34+AC133+ cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-initiating cells, NOD/SCID-repopulating cells and dendritic cell progenitors." *Stem Cells* **16**(6): 387-396.
- Dean, M., T. Fojo, et al. (2005). "Tumour stem cells and drug resistance." *Nat Rev Cancer* **5**(4): 275-284.
- Ding, Q., M. Yoshimitsu, et al. (2012). "Establishment of a highly migratory subclone reveals that CD133 contributes to migration and invasion through epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer." *Hum Cell* **25**(1): 1-8.
- Du, L., H. Wang, et al. (2008). "CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells." *Clin Cancer Res* **14**(21): 6751-6760.
- Dubreuil, V., A. M. Marzesco, et al. (2007). "Midbody and primary cilium of neural progenitors release extracellular membrane particles enriched in the stem cell marker prominin-1." *J Cell Biol* **176**(4): 483-495.
- Elsaba, T. M., L. Martinez-Pomares, et al. (2010). "The stem cell marker CD133 associates with enhanced colony formation and cell motility in colorectal cancer." *PLoS One* **5**(5): e10714.
- Eppert, K., K. Takenaka, et al. (2011). "Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia." *Nat Med* **17**(9): 1086-1093.
- Ettinger, A. W., M. Wilsch-Brauninger, et al. (2011). "Proliferating versus differentiating stem and cancer cells exhibit distinct midbody-release behaviour." *Nat Commun* **2**: 503.
- Fang, D. D., Y. J. Kim, et al. (2010). "Expansion of CD133(+) colon cancer cultures retaining stem cell properties to enable cancer stem cell target discovery." *Br J Cancer* **102**(8): 1265-1275.
- Fargeas, C. A., D. Corbeil, et al. (2003). "AC133 antigen, CD133, prominin-1, prominin-2, etc.: prominin family gene products in need of a rational nomenclature." *Stem Cells* **21**(4): 506-508.
- Fargeas, C. A., M. Florek, et al. (2003). "Characterization of prominin-2, a new member of the prominin family of pentaspan membrane glycoproteins." *J Biol Chem* **278**(10): 8586-8596.
- Fargeas, C. A., W. B. Huttner, et al. (2007). "Nomenclature of prominin-1 (CD133) splice variants - an update." *Tissue Antigens* **69**(6): 602-606.
- Fargeas, C. A., A. Joester, et al. (2004). "Identification of novel Prominin-1/CD133 splice variants with alternative C-termini and their expression in epididymis and testis." *J Cell Sci* **117**(Pt 18): 4301-4311.
- Florek, M., M. Haase, et al. (2005). "Prominin-1/CD133, a neural and hematopoietic stem cell marker, is expressed in adult human differentiated cells and certain types of kidney cancer." *Cell Tissue Res* **319**(1): 15-26.
- Foulds, L. (1958). "The natural history of cancer." *J Chronic Dis* **8**(1): 2-37.
- Frank, N. Y., A. Margaryan, et al. (2005). "ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma." *Cancer Res* **65**(10): 4320-4333.
- Friel, A. M., L. Zhang, et al. (2010). "Epigenetic regulation of CD133 and tumorigenicity of CD133 positive and negative endometrial cancer cells." *Reprod Biol Endocrinol* **8**: 147.
- Furst, G., J. Schulte am Esch, et al. (2007). "Portal vein embolization and autologous CD133+ bone marrow stem cells for liver regeneration: initial experience." *Radiology* **243**(1): 171-179.

- Gehling, U. M., S. Ergun, et al. (2000). "In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells." *Blood* **95**(10): 3106-3112.
- Gilbertson, R. J. and J. N. Rich (2007). "Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche." *Nat Rev Cancer* **7**(10): 733-736.
- Gires, O. (2011). "Lessons from common markers of tumor-initiating cells in solid cancers." *Cell Mol Life Sci* **68**(24): 4009-4022.
- Gires, O., C. A. Klein, et al. (2009). "On the abundance of EpCAM on cancer stem cells." *Nat Rev Cancer* **9**(2): 143; author reply 143.
- Gopisetty, G., J. Xu, et al. (2012). "Epigenetic regulation of CD133/PROM1 expression in glioma stem cells by Sp1/myc and promoter methylation." *Oncogene*.
- Graham, F. L., J. Smiley, et al. (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." *J Gen Virol* **36**(1): 59-74.
- Greaves, M. and C. C. Maley (2012). "Clonal evolution in cancer." *Nature* **481**(7381): 306-313.
- Gregory, C. A., D. J. Prockop, et al. (2005). "Non-hematopoietic bone marrow stem cells: molecular control of expansion and differentiation." *Exp Cell Res* **306**(2): 330-335.
- Gupta, P. B., C. L. Chaffer, et al. (2009). "Cancer stem cells: mirage or reality?" *Nat Med* **15**(9): 1010-1012.
- Hanahan, D. and L. M. Coussens (2012). "Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment." *Cancer Cell* **21**(3): 309-322.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.
- Hao, H. N., J. Zhao, et al. (2003). "Fetal human hematopoietic stem cells can differentiate sequentially into neural stem cells and then astrocytes in vitro." *J Hematother Stem Cell Res* **12**(1): 23-32.
- Haraguchi, N., M. Ohkuma, et al. (2008). "CD133+CD44+ population efficiently enriches colon cancer initiating cells." *Ann Surg Oncol* **15**(10): 2927-2933.
- Harburger, D. S., M. Bouaouina, et al. (2009). "Kindlin-1 and -2 directly bind the C-terminal region of beta integrin cytoplasmic tails and exert integrin-specific activation effects." *J Biol Chem* **284**(17): 11485-11497.
- Hashimoto, O., K. Shimizu, et al. (2011). "Hypoxia induces tumor aggressiveness and the expansion of CD133-positive cells in a hypoxia-inducible factor-1alpha-dependent manner in pancreatic cancer cells." *Pathobiology* **78**(4): 181-192.
- Hass, R., L. Kohler, et al. (1990). "Alterations in glycosylation and lectin pattern during phorbol ester-induced differentiation of U937 cells." *Cancer Res* **50**(2): 323-327.
- Hemmoranta, H., T. Satomaa, et al. (2007). "N-glycan structures and associated gene expression reflect the characteristic N-glycosylation pattern of human hematopoietic stem and progenitor cells." *Exp Hematol* **35**(8): 1279-1292.
- Herz, C., M. Aumailley, et al. (2006). "Kindlin-1 is a phosphoprotein involved in regulation of polarity, proliferation, and motility of epidermal keratinocytes." *J Biol Chem* **281**(47): 36082-36090.
- Hess, D. A., L. Wirthlin, et al. (2006). "Selection based on CD133 and high aldehyde dehydrogenase activity isolates long-term reconstituting human hematopoietic stem cells." *Blood* **107**(5): 2162-2169.
- Hibi, K., M. Sakata, et al. (2009). "Demethylation of the CD133 gene is frequently detected in advanced colorectal cancer." *Anticancer Res* **29**(6): 2235-2237.
- Hibi, K., M. Sakata, et al. (2010). "Demethylation of the CD133 gene is frequently detected in early gastric carcinoma." *Anticancer Res* **30**(4): 1201-1203.
- Hlubek, F., T. Brabletz, et al. (2007). "Heterogeneous expression of Wnt/beta-catenin target genes within colorectal cancer." *Int J Cancer* **121**(9): 1941-1948.
- Hoffman, L. M. and M. K. Carpenter (2005). "Characterization and culture of human embryonic stem cells." *Nat Biotechnol* **23**(6): 699-708.
- Horst, D., L. Kriegel, et al. (2009). "CD133 and nuclear beta-catenin: the marker combination to detect high risk cases of low stage colorectal cancer." *Eur J Cancer* **45**(11): 2034-2040.

- Horst, D., L. Kriegel, et al. (2008). "CD133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer." *Br J Cancer* **99**(8): 1285-1289.
- Horst, D., S. K. Scheel, et al. (2009). "The cancer stem cell marker CD133 has high prognostic impact but unknown functional relevance for the metastasis of human colon cancer." *J Pathol* **219**(4): 427-434.
- Hu, W. and J. Collier (2012). "What comes first: translational repression or mRNA degradation? The deepening mystery of microRNA function." *Cell Res* **22**(9): 1322-1324.
- Huang, B., Z. Qu, et al. (2012). "RUNX3 acts as a tumor suppressor in breast cancer by targeting estrogen receptor alpha." *Oncogene* **31**(4): 527-534.
- Huang, E. H., M. J. Hynes, et al. (2009). "Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis." *Cancer Res* **69**(8): 3382-3389.
- Iida, H., M. Suzuki, et al. (2012). "Hypoxia induces CD133 expression in human lung cancer cells by up-regulation of OCT3/4 and SOX2." *Int J Oncol* **40**(1): 71-79.
- Ishigami, S., S. Ueno, et al. (2010). "Prognostic impact of CD133 expression in gastric carcinoma." *Anticancer Res* **30**(6): 2453-2457.
- Jang, Y. K., J. J. Park, et al. (2004). "Retinoic acid-mediated induction of neurons and glial cells from human umbilical cord-derived hematopoietic stem cells." *J Neurosci Res* **75**(4): 573-584.
- Janich, P. and D. Corbeil (2007). "GM1 and GM3 gangliosides highlight distinct lipid microdomains within the apical domain of epithelial cells." *FEBS Lett* **581**(9): 1783-1787.
- Jaszai, J., C. A. Fargeas, et al. (2007). "Focus on molecules: prominin-1 (CD133)." *Exp Eye Res* **85**(5): 585-586.
- Jaszai, J., P. Janich, et al. (2007). "Differential expression of Prominin-1 (CD133) and Prominin-2 in major cephalic exocrine glands of adult mice." *Histochem Cell Biol* **128**(5): 409-419.
- Jeon, Y. K., S. H. Kim, et al. (2010). "Promoter hypermethylation and loss of CD133 gene expression in colorectal cancers." *World J Gastroenterol* **16**(25): 3153-3160.
- Jiang, T., B. J. Collins, et al. (2009). "Achaete-scute complex homologue 1 regulates tumor-initiating capacity in human small cell lung cancer." *Cancer Res* **69**(3): 845-854.
- Jiang, X., Y. Gwyne, et al. (2010). "CD133 expression in chemo-resistant Ewing sarcoma cells." *BMC Cancer* **10**: 116.
- Jordan, M. A., D. Thrower, et al. (1992). "Effects of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles. Implications for the role of microtubule dynamics in mitosis." *J Cell Sci* **102** (Pt 3): 401-416.
- Kalluri, R. and R. A. Weinberg (2009). "The basics of epithelial-mesenchymal transition." *J Clin Invest* **119**(6): 1420-1428.
- Kania, G., D. Corbeil, et al. (2005). "Somatic stem cell marker prominin-1/CD133 is expressed in embryonic stem cell-derived progenitors." *Stem Cells* **23**(6): 791-804.
- Karbanova, J., E. Missol-Kolka, et al. (2008). "The stem cell marker CD133 (Prominin-1) is expressed in various human glandular epithelia." *J Histochem Cytochem* **56**(11): 977-993.
- Kaufman, D. S., E. T. Hanson, et al. (2001). "Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(19): 10716-10721.
- Kemper, K., M. R. Sprick, et al. (2010). "The AC133 epitope, but not the CD133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation." *Cancer Res* **70**(2): 719-729.
- Kemper, K., M. Versloot, et al. (2012). "Mutations in the Ras-Raf Axis underlie the prognostic value of CD133 in colorectal cancer." *Clin Cancer Res* **18**(11): 3132-3141.
- Kleinsmith, L. J. and G. B. Pierce, Jr. (1964). "Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells." *Cancer Res* **24**: 1544-1551.
- Knudson, A. G. (2001). "Two genetic hits (more or less) to cancer." *Nat Rev Cancer* **1**(2): 157-162.
- Koehl, U., S. Zimmermann, et al. (2002). "Autologous transplantation of CD133 selected hematopoietic progenitor cells in a pediatric patient with relapsed leukemia." *Bone Marrow Transplant* **29**(11): 927-930.
- Krishnamurthy, S. and J. E. Nor (2012). "Head and neck cancer stem cells." *J Dent Res* **91**(4): 334-340.

- Kucharska, A., L. K. Rushworth, et al. (2009). "Regulation of the inducible nuclear dual-specificity phosphatase DUSP5 by ERK MAPK." *Cell Signal* **21**(12): 1794-1805.
- Kusumbe, A. P., A. M. Mali, et al. (2009). "CD133-expressing stem cells associated with ovarian metastases establish an endothelial hierarchy and contribute to tumor vasculature." *Stem Cells* **27**(3): 498-508.
- Lang, P., P. Bader, et al. (2004). "Transplantation of a combination of CD133+ and CD34+ selected progenitor cells from alternative donors." *Br J Haematol* **124**(1): 72-79.
- Lardon, J., D. Corbeil, et al. (2008). "Stem cell marker prominin-1/AC133 is expressed in duct cells of the adult human pancreas." *Pancreas* **36**(1): e1-6.
- Lathia, J. D., M. Hitomi, et al. (2011). "Distribution of CD133 reveals glioma stem cells self-renew through symmetric and asymmetric cell divisions." *Cell Death Dis* **2**: e200.
- Lee, A., J. D. Kessler, et al. (2005). "Isolation of neural stem cells from the postnatal cerebellum." *Nat Neurosci* **8**(6): 723-729.
- Lee, S. H., J. Kim, et al. (2009). "Hypoxic silencing of tumor suppressor RUNX3 by histone modification in gastric cancer cells." *Oncogene* **28**(2): 184-194.
- Levenberg, S., J. S. Golub, et al. (2002). "Endothelial cells derived from human embryonic stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(7): 4391-4396.
- Li, C., D. G. Heidt, et al. (2007). "Identification of pancreatic cancer stem cells." *Cancer Res* **67**(3): 1030-1037.
- Li, F., H. Zeng, et al. (2011). "The combination of stem cell markers CD133 and ABCG2 predicts relapse in stage I non-small cell lung carcinomas." *Med Oncol* **28**(4): 1458-1462.
- Li, Z., S. Bao, et al. (2009). "Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells." *Cancer Cell* **15**(6): 501-513.
- Liu, G., X. Yuan, et al. (2006). "Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma." *Mol Cancer* **5**: 67.
- Lottaz, C., D. Beier, et al. (2010). "Transcriptional profiles of CD133+ and CD133- glioblastoma-derived cancer stem cell lines suggest different cells of origin." *Cancer Res* **70**(5): 2030-2040.
- Ma, S., T. K. Lee, et al. (2008). "CD133+ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway." *Oncogene* **27**(12): 1749-1758.
- Machado-Silva, A., S. Perrier, et al. (2010). "p53 family members in cancer diagnosis and treatment." *Semin Cancer Biol* **20**(1): 57-62.
- Maeda, S., H. Shinichi, et al. (2008). "CD133 expression is correlated with lymph node metastasis and vascular endothelial growth factor-C expression in pancreatic cancer." *Br J Cancer* **98**(8): 1389-1397.
- Magee, J. A., E. Piskounova, et al. (2012). "Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty." *Cancer Cell* **21**(3): 283-296.
- Mak, A. B., K. M. Blakely, et al. (2011). "CD133 protein N-glycosylation processing contributes to cell surface recognition of the primitive cell marker AC133 epitope." *J Biol Chem* **286**(47): 41046-41056.
- Malagolini, N., D. Cavallone, et al. (2000). "Differentiation-dependent glycosylation of gp190, an oncofetal crypt cell antigen expressed by Caco-2 cells." *Glycoconj J* **17**(5): 307-314.
- Maley, F., R. B. Trimble, et al. (1989). "Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases." *Anal Biochem* **180**(2): 195-204.
- Mandal, M., J. N. Myers, et al. (2008). "Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous carcinoma: association of Src activation with E-cadherin down-regulation, vimentin expression, and aggressive tumor features." *Cancer* **112**(9): 2088-2100.
- Mani, S. A., W. Guo, et al. (2008). "The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells." *Cell* **133**(4): 704-715.
- Marotta, L. L. and K. Polyak (2009). "Cancer stem cells: a model in the making." *Curr Opin Genet Dev* **19**(1): 44-50.
- Marzesco, A. M., P. Janich, et al. (2005). "Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells." *J Cell Sci* **118**(Pt 13): 2849-2858.

- Marzesco, A. M., M. Wilsch-Brauninger, et al. (2009). "Release of extracellular membrane vesicles from microvilli of epithelial cells is enhanced by depleting membrane cholesterol." *FEBS Lett* **583**(5): 897-902.
- Matsumoto, K., T. Arao, et al. (2009). "mTOR signal and hypoxia-inducible factor-1 alpha regulate CD133 expression in cancer cells." *Cancer Res* **69**(18): 7160-7164.
- Maw, M. A., D. Corbeil, et al. (2000). "A frameshift mutation in prominin (mouse)-like 1 causes human retinal degeneration." *Hum Mol Genet* **9**(1): 27-34.
- Melamud, A., R. Palekar, et al. (2006). "Retinoblastoma." *Am Fam Physician* **73**(6): 1039-1044.
- Meregalli, M., A. Farini, et al. (2012). "The role of stem cells in muscular dystrophies." *Curr Gene Ther* **12**(3): 192-205.
- Merlo, L. M., J. W. Pepper, et al. (2006). "Cancer as an evolutionary and ecological process." *Nat Rev Cancer* **6**(12): 924-935.
- Metellus, P., I. Nanni-Metellus, et al. (2011). "Prognostic impact of CD133 mRNA expression in 48 glioblastoma patients treated with concomitant radiochemotherapy: a prospective patient cohort at a single institution." *Ann Surg Oncol* **18**(10): 2937-2945.
- Miraglia, S., W. Godfrey, et al. (1997). "A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning." *Blood* **90**(12): 5013-5021.
- Missol-Kolka, E., J. Karbanova, et al. (2011). "Prominin-1 (CD133) is not restricted to stem cells located in the basal compartment of murine and human prostate." *Prostate* **71**(3): 254-267.
- Mizrak, D., M. Brittan, et al. (2008). "CD133: molecule of the moment." *J Pathol* **214**(1): 3-9.
- Moitra, K., H. Lou, et al. (2011). "Multidrug efflux pumps and cancer stem cells: insights into multidrug resistance and therapeutic development." *Clin Pharmacol Ther* **89**(4): 491-502.
- Nowell, P. C. (1976). "The clonal evolution of tumor cell populations." *Science* **194**(4260): 23-28.
- O'Brien, C. A., A. Pollett, et al. (2007). "A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice." *Nature* **445**(7123): 106-110.
- Ogden, A. T., A. E. Waziri, et al. (2008). "Identification of A2B5+CD133- tumor-initiating cells in adult human gliomas." *Neurosurgery* **62**(2): 505-514; discussion 514-505.
- Ong, C. W., L. G. Kim, et al. (2010). "CD133 expression predicts for non-response to chemotherapy in colorectal cancer." *Mod Pathol* **23**(3): 450-457.
- Osmond, T. L., K. W. Broadley, et al. (2010). "Glioblastoma cells negative for the anti-CD133 antibody AC133 express a truncated variant of the CD133 protein." *Int J Mol Med* **25**(6): 883-888.
- Padovan, C. S., K. Jahn, et al. (2003). "Expression of neuronal markers in differentiated marrow stromal cells and CD133+ stem-like cells." *Cell Transplant* **12**(8): 839-848.
- Pallini, R., L. Ricci-Vitiani, et al. (2011). "Expression of the stem cell marker CD133 in recurrent glioblastoma and its value for prognosis." *Cancer* **117**(1): 162-174.
- Peichev, M., A. J. Naiyer, et al. (2000). "Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors." *Blood* **95**(3): 952-958.
- Pellacani, D., R. J. Packer, et al. (2011). "Regulation of the stem cell marker CD133 is independent of promoter hypermethylation in human epithelial differentiation and cancer." *Mol Cancer* **10**: 94.
- Pfenninger, C. V., T. Roschupkina, et al. (2007). "CD133 is not present on neurogenic astrocytes in the adult subventricular zone, but on embryonic neural stem cells, ependymal cells, and glioblastoma cells." *Cancer Res* **67**(12): 5727-5736.
- Piccirillo, S. G., B. A. Reynolds, et al. (2006). "Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells." *Nature* **444**(7120): 761-765.
- Pietras, K. and A. Ostman (2010). "Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma." *Exp Cell Res* **316**(8): 1324-1331.
- Piras, F., M. T. Perra, et al. (2010). "The stem cell marker nestin predicts poor prognosis in human melanoma." *Oncol Rep* **23**(1): 17-24.
- Plank, C., M. Anton, et al. (2003). "Enhancing and targeting nucleic acid delivery by magnetic force." *Expert Opin Biol Ther* **3**(5): 745-758.

- Plzak, J., Z. Holikova, et al. (2002). "Differentiation-dependent glycosylation of cells in squamous cell epithelia detected by a mammalian lectin." *Cells Tissues Organs* **171**(2-3): 135-144.
- Potgens, A. J., U. Schmitz, et al. (2002). "Monoclonal antibody CD133-2 (AC141) against hematopoietic stem cell antigen CD133 shows crossreactivity with cytokeratin 18." *J Histochem Cytochem* **50**(8): 1131-1134.
- Quintana, E., M. Shackleton, et al. (2008). "Efficient tumour formation by single human melanoma cells." *Nature* **456**(7222): 593-598.
- Ranganathan, R. and E. M. Ross (1997). "PDZ domain proteins: scaffolds for signaling complexes." *Curr Biol* **7**(12): R770-773.
- Ricci-Vitiani, L., E. Fabrizi, et al. (2009). "Colon cancer stem cells." *J Mol Med (Berl)* **87**(11): 1097-1104.
- Ricci-Vitiani, L., D. G. Lombardi, et al. (2007). "Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells." *Nature* **445**(7123): 111-115.
- Richardson, G. D., C. N. Robson, et al. (2004). "CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells." *J Cell Sci* **117**(Pt 16): 3539-3545.
- Robert-Koch-Institut (2012). Krebs in Deutschland 2007/2008. R. K.-I. H. u. d. G. d. e. K. i. D. e. V. (Hrsg). Berlin, Robert Koch-Institut. **8. Ausgabe.**
- Rocco, A., E. Liguori, et al. (2012). "CD133 and CD44 cell surface markers do not identify cancer stem cells in primary human gastric tumors." *J Cell Physiol* **227**(6): 2686-2693.
- Roper, K., D. Corbeil, et al. (2000). "Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid micro-domains in the apical plasma membrane." *Nat Cell Biol* **2**(9): 582-592.
- Roussos, E. T., J. S. Condeelis, et al. (2011). "Chemotaxis in cancer." *Nat Rev Cancer* **11**(8): 573-587.
- Ruffell, B., D. G. DeNardo, et al. (2010). "Lymphocytes in cancer development: polarization towards pro-tumor immunity." *Cytokine Growth Factor Rev* **21**(1): 3-10.
- Rutella, S., G. Bonanno, et al. (2009). "Cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the CD133 antigen in human endometrial tumors." *Clin Cancer Res* **15**(13): 4299-4311.
- Sagrinati, C., G. S. Netti, et al. (2006). "Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys." *J Am Soc Nephrol* **17**(9): 2443-2456.
- Salnikov, A. V., J. Gladkich, et al. (2010). "CD133 is indicative for a resistance phenotype but does not represent a prognostic marker for survival of non-small cell lung cancer patients." *Int J Cancer* **126**(4): 950-958.
- Sartelet, H., T. Imbriglio, et al. (2012). "CD133 expression is associated with poor outcome in neuroblastoma via chemoresistance mediated by the AKT pathway." *Histopathology* **60**(7): 1144-1155.
- Satomaa, T., A. Heiskanen, et al. (2009). "The N-glycome of human embryonic stem cells." *BMC Cell Biol* **10**: 42.
- Savagner, P. (2010). "The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon." *Ann Oncol* **21 Suppl 7**: vii89-92.
- Scheel, C. and R. A. Weinberg (2012). "Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links." *Semin Cancer Biol* **22**(5-6): 396-403.
- Shackleton, M., E. Quintana, et al. (2009). "Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution." *Cell* **138**(5): 822-829.
- Shamblott, M. J., J. Axelman, et al. (2001). "Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(1): 113-118.
- Shen, C., M. Gu, et al. (2008). "The tumorigenicity diversification in human embryonic kidney 293 cell line cultured in vitro." *Biologicals* **36**(4): 263-268.
- Shmelkov, S. V., J. M. Butler, et al. (2008). "CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors." *J Clin Invest* **118**(6): 2111-2120.
- Shmelkov, S. V., L. Jun, et al. (2004). "Alternative promoters regulate transcription of the gene that encodes stem cell surface protein AC133." *Blood* **103**(6): 2055-2061.

- Simons, M. and G. Raposo (2009). "Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication." *Curr Opin Cell Biol* **21**(4): 575-581.
- Singh, S. K., I. D. Clarke, et al. (2003). "Identification of a cancer stem cell in human brain tumors." *Cancer Res* **63**(18): 5821-5828.
- Singh, S. K., C. Hawkins, et al. (2004). "Identification of human brain tumour initiating cells." *Nature* **432**(7015): 396-401.
- Soeda, A., M. Park, et al. (2009). "Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha." *Oncogene* **28**(45): 3949-3959.
- Song, W., H. Li, et al. (2008). "Expression and clinical significance of the stem cell marker CD133 in hepatocellular carcinoma." *Int J Clin Pract* **62**(8): 1212-1218.
- Stamm, C., B. Westphal, et al. (2003). "Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration." *Lancet* **361**(9351): 45-46.
- Stratton, M. R. (2011). "Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise." *Science* **331**(6024): 1553-1558.
- Sun, C., H. Song, et al. (2012). "CD133 expression in renal cell carcinoma (RCC) is correlated with nuclear hypoxia-inducing factor 1alpha (HIF-1alpha)." *J Cancer Res Clin Oncol* **138**(10): 1619-1624.
- Sun, Y., W. Kong, et al. (2009). "CD133 (Prominin) negative human neural stem cells are clonogenic and tripotent." *PLoS One* **4**(5): e5498.
- Tabu, K., K. Sasai, et al. (2008). "Promoter hypomethylation regulates CD133 expression in human gliomas." *Cell Res* **18**(10): 1037-1046.
- Taieb, N., M. Maresca, et al. (2009). "The first extracellular domain of the tumour stem cell marker CD133 contains an antigenic ganglioside-binding motif." *Cancer Lett* **278**(2): 164-173.
- Tang, J., G. Hu, et al. (2006). "A critical role for calponin 2 in vascular development." *J Biol Chem* **281**(10): 6664-6672.
- Tirino, V., V. Desiderio, et al. (2011). "Human primary bone sarcomas contain CD133+ cancer stem cells displaying high tumorigenicity in vivo." *FASEB J* **25**(6): 2022-2030.
- Tiwari, N., A. Gheldof, et al. (2012). "EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells." *Semin Cancer Biol* **22**(3): 194-207.
- Todaro, M., M. P. Alea, et al. (2007). "Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4." *Cell Stem Cell* **1**(4): 389-402.
- Todaro, M., M. Perez Alea, et al. (2008). "IL-4-mediated drug resistance in colon cancer stem cells." *Cell Cycle* **7**(3): 309-313.
- Tonikian, R., Y. Zhang, et al. (2008). "A specificity map for the PDZ domain family." *PLoS Biol* **6**(9): e239.
- Torrente, Y., M. Belicchi, et al. (2004). "Human circulating AC133(+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle." *J Clin Invest* **114**(2): 182-195.
- Uchida, N., D. W. Buck, et al. (2000). "Direct isolation of human central nervous system stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(26): 14720-14725.
- Ursini-Siegel, J., A. B. Rajput, et al. (2007). "Elevated expression of DecR1 impairs ErbB2/Neu-induced mammary tumor development." *Mol Cell Biol* **27**(18): 6361-6371.
- Valencia-Sanchez, M. A., J. Liu, et al. (2006). "Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs." *Genes Dev* **20**(5): 515-524.
- Vander Griend, D. J., W. L. Karthaus, et al. (2008). "The role of CD133 in normal human prostate stem cells and malignant cancer-initiating cells." *Cancer Res* **68**(23): 9703-9711.
- Vermeulen, L., M. Todaro, et al. (2008). "Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(36): 13427-13432.
- Voon, D. C., H. Wang, et al. (2012). "Runx3 protects gastric epithelial cells against epithelial-mesenchymal transition-induced cellular plasticity and tumorigenicity." *Stem Cells* **30**(10): 2088-2099.
- Wang, J., P. O. Sakariassen, et al. (2008). "CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells." *Int J Cancer* **122**(4): 761-768.

- Weigmann, A., D. Corbeil, et al. (1997). "Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(23): 12425-12430.
- Xin, H., J. C. Stephans, et al. (2000). "Identification of a novel aspartic-like protease differentially expressed in human breast cancer cell lines." *Biochim Biophys Acta* **1501**(2-3): 125-137.
- Yang, Z., Y. Chen, et al. (2008). "Mutant prominin 1 found in patients with macular degeneration disrupts photoreceptor disk morphogenesis in mice." *J Clin Invest* **118**(8): 2908-2916.
- Yang, Z. J., T. Ellis, et al. (2008). "Medulloblastoma can be initiated by deletion of Patched in lineage-restricted progenitors or stem cells." *Cancer Cell* **14**(2): 135-145.
- Yi, J. M., H. C. Tsai, et al. (2008). "Abnormal DNA methylation of CD133 in colorectal and glioblastoma tumors." *Cancer Res* **68**(19): 8094-8103.
- Yi, L., Z. H. Zhou, et al. (2007). "Isolation and characterization of stem cell-like precursor cells from primary human anaplastic oligoastrocytoma." *Mod Pathol* **20**(10): 1061-1068.
- Yin, A. H., S. Miraglia, et al. (1997). "AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells." *Blood* **90**(12): 5002-5012.
- Yin, S., J. Li, et al. (2007). "CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity." *Int J Cancer* **120**(7): 1444-1450.
- You, H., W. Ding, et al. (2010). "Epigenetic regulation of cancer stem cell marker CD133 by transforming growth factor-beta." *Hepatology* **51**(5): 1635-1644.
- Yu, C. C., G. Y. Chiou, et al. (2010). "Medulloblastoma-derived tumor stem-like cells acquired resistance to TRAIL-induced apoptosis and radiosensitivity." *Childs Nerv Syst* **26**(7): 897-904.
- Yu, Y., A. Flint, et al. (2002). "AC133-2, a novel isoform of human AC133 stem cell antigen." *J Biol Chem* **277**(23): 20711-20716.
- Zacchigna, S., H. Oh, et al. (2009). "Loss of the cholesterol-binding protein prominin-1/CD133 causes disk dysmorphogenesis and photoreceptor degeneration." *J Neurosci* **29**(7): 2297-2308.
- Zeppernick, F., R. Ahmadi, et al. (2008). "Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients." *Clin Cancer Res* **14**(1): 123-129.
- Zhang, Q., S. Shi, et al. (2010). "A subpopulation of CD133(+) cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy." *Cancer Lett* **289**(2): 151-160.
- Zhang, Q., F. Zulficar, et al. (2007). "Severe retinitis pigmentosa mapped to 4p15 and associated with a novel mutation in the PROM1 gene." *Hum Genet* **122**(3-4): 293-299.
- Zhao, P., Y. Lu, et al. (2011). "Clinicopathological significance and prognostic value of CD133 expression in triple-negative breast carcinoma." *Cancer Sci* **102**(5): 1107-1111.
- Zhong, X., Y. Li, et al. (2007). "Identification of tumorigenic retinal stem-like cells in human solid retinoblastomas." *Int J Cancer* **121**(10): 2125-2131.
- Zhou, F., C. Cui, et al. (2010). "Alpha2,3-Sialylation regulates the stability of stem cell marker CD133." *J Biochem* **148**(3): 273-280.
- Zhou, J., H. Wang, et al. (2011). "Side population rather than CD133(+) cells distinguishes enriched tumorigenicity in hTERT-immortalized primary prostate cancer cells." *Mol Cancer* **10**: 112.
- Zobalova, R., M. Stantic, et al. (2008). "Cancer cells with high expression of CD133 exert FLIP upregulation and resistance to TRAIL-induced apoptosis." *Biofactors* **34**(3): 231-235.
- Zoller, M. (2011). "CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule?" *Nat Rev Cancer* **11**(4): 254-267.

8 Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Martin Canis und Herrn Prof. Dr. Olivier Gires bedanken, dass sie mir die Möglichkeit gegeben haben, meine Doktorarbeit in der Forschungsabteilung der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde im Klinikum Großhadern anzufertigen. Als kompetente und hilfsbereite Ansprechpartner waren mir beide eine unerlässliche Stütze und standen mir stets mit Rat und Tat zur Seite. Ihre Begeisterung und Freude an der Forschung sowie das Interesse daran, Wissen zu vermitteln, erleichterten mir die Arbeit ungemein. Diese herausragende Unterstützung und das großes Engagement trugen maßgeblich zum Gelingen der Arbeit bei.

Auch all meinen Laborkollegen danke ich herzlich für die Hilfen, Ratschläge und genauso für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die es mir ermöglichte, mich auch in schwierigen Zeiten jeden Tag aufs Neue zu motivieren. Insbesondere Frau Brigitte Mack, Frau Carola Eggert, Frau Dr. Sabine Denzel, Frau Dr. Bárbara González Carvajal und Herr Dr. Rahul Date waren mir eine große Hilfe mit ihrer geduldigen Einarbeitung und ihren wichtigen Ratschlägen. Ihre Hilfsbereitschaft bei Fragen und Problemen wusste ich sehr zu schätzen.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern und Geschwistern, die mich während meines gesamten Studiums und der Anfertigung der Promotionsarbeit nach Kräften unterstützten. Ohne diesen bedingungslosen Rückhalt über all die Jahre wären mir viele Hürden und Anforderungen während der Doktorarbeit und des Studiums viel größer gewesen.

9 Veröffentlichung

Teilaspekte der Arbeit fanden Eingang in folgende Veröffentlichung:

Canis, M. *, **Lechner, A.** *, Mack, B., Zengel, P., Laubender, R.P., Koehler, U., Heissmeyer, V., and Gires, O. (2013). CD133 induces tumour-initiating properties in HEK293 cells. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 34, 437-443.

*) geteilte Erstautorenschaft

Eidesstattliche Versicherung

Lechner, Axel

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Die Rolle des Tumorstammzellmarkers CD133 in der Initiierung von Tumoren

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand